BoHV-4

Test ELISA pour le diagnostic sérologique
de l'Herpès virus bovin de type 4
Test indirect pour sérums sanguins, plasmas et laits
Test diagnostique pour bovins
Monocupule

I - INTRODUCTION

Le BoHV-4 (Bovine herpesvirus-4) est considéré comme un agent pathogène probable du bétail. Ce virus a été isolé de bovins présentant divers syndromes cliniques. Il est souvent associé aux pathologies touchant la sphère génitale (orchite, métrite). On a pu également l'isoler à partir de bovins souffrant de troubles oculaires, respiratoires, digestifs ou de lésions cutanées. Il a également pu être mis en évidence chez des animaux apparemment sains.
Il est possible de diagnostiquer une affection causée par le BoHV-4 en isolant le virus sur une lignée cellulaire susceptible. La croissance du virus sur cette lignée cellulaire peut être mise en évidence par un anticorps spécifique du virus et couplé à un fluorochrome.

II - PRINCIPE DU TEST

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par du virus BoHV-4 purifié. L'entièreté des microplaques est sensibilisée par le virus. Les sérums sanguins et les plasmas sont dilués dans le tampon de dilution. Les laits sont utilisés purs. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute le conjugué, de la protéine G couplée à la peroxydase. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à 21°C +/- 3°C et d'un second lavage, on ajoute la solution de révélation (TMB monocomposant). Ce chromogène présente le double avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérigène. En cas de présence d'immunoglobulines spécifiques du BoHV-4 dans le sérum, le plasma ou dans le lait, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant l'antigène viral et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en anticorps spécifiques présents dans l'échantillon.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : microplaques de 96 puits (barrettes de 8 puits). L'entièreté des microplaques est senbilisée par l'antigène viral.
- **Solution de lavage** : 1 flacon de 100 ml de solution de lavage concentrée 20 fois. La solution cristallise spontanément à froid. En cas d'utilisation partielle, amener le flacon à 21°C +/- 3°C jusqu'à disparition

complète des cristaux, mélanger la solution et prélever le volume nécessaire. Diluer 20 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée.

- **Tampon de dilution** : 1 flacon de 50 ml de tampon de dilution coloré concentré 5 fois. Le contenu du flacon est à diluer dans de l'eau distillée ou déminéralisée. Cette solution est utilisée pour la dilution des sérums sanguins, des plasmas et du conjugué. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.
- **Conjugué** : 1 flacon de Protéine G couplée à la peroxydase de raifort.
- **Sérum positif** : 1 flacon contenant le sérum positif. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
- **Sérum négatif** : 1 flacon contenant le sérum négatif. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
- **Traceur** : 1 flacon contenant le traceur. Reconstituer ce réactif avec 0,5 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Après reconstitution, le réactif se conserve à -20°C. Répartir ce réactif en plusieurs fractions avant de le congeler afin d'éviter les cycles de congélation-décongélation. Si ces précautions sont respectées, le réactif peut être conservé plusieurs mois.
  Le traceur est un échantillon de référence qui peut être utilisé pour contrôler la reproductibilité intra-laboratoire du lot de la trousse.
  Reproductibilité intra-laboratoire : degré de concordance entre des résultats d'analyses réitérées d'un même échantillon avec un protocole technique identique, dans un laboratoire donné dans des conditions opératoires variables.
- **Solution de TMB monocomposant**: 1 flacon de chromogène TMB (tétraméthylbenzidine). Ce réactif se conserve entre +2°C et +8°C à l'abri de la lumière. **Il est prêt à l'emploi.**
- **Solution d'arrêt** : 1 flacon de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 312/1	BIO K 312/2
Microplaques	1	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution	1 X 50 ml (5 X)	1 X 50 ml (5 X)
Conjugué	1 X 0,3 ml (50 X)	1 X 0,5 ml (50 X)
Sérum positif	1 X 0,5 ml (1 X)	1 X 0,5 ml (1 X)
Sérum négatif	1 X 0,5 ml (1 X)	1 X 0,5 ml (1 X)
Traceur	1 X 0,5 ml (lyophilisé)	1 X 0,5 ml (lyophilisé)
Solution TMB mono-composant	1 X 12 ml (1 X)	1 X 25 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 X 6 ml (1 X)	1 X 15 ml (1 X)

IV- MATERIEL SUPPLEMENTAIRE ET EQUIPEMENTS REQUIS

Eau distillée, cylindres gradués, Béchers, tubes en plastic, portoir pour tubes, microplaques de dilution, pointes, réservoir à réactifs pour pipettes multicanaux, couvercle, adhésif pour microplaques, pipettes automatiques graduées (mono et multicanaux), lecteur de microplaque, laveur et agitateur de microplaques (optionnel).

V - PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce test ne peut être utilisé que pour un diagnostic "in vitro" et il est à usage strictement vétérinaire.
- Les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C. Les réactifs ne peuvent être garantis si leur date de péremption est dépassée et/ou s'ils n'ont pas été conservés dans les conditions décrites dans cette notice.
- La solution de lavage et le tampon de dilution concentrés peuvent être stockés à température ambiante. Après dilution, ces solutions ont une stabilité de 6 semaines entre +2°C et +8°C.
- Les barrettes non utilisées doivent être stockées immédiatement dans l'enveloppe d'aluminium en veillant à conserver le dessicant bien sec et en fermant hermétiquement l'enveloppe. Si ces précautions sont scrupuleusement respectées, il est possible de préserver l'activité des barrettes jusqu'à la date de péremption de la trousse.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres trousses.
- Il est important de veiller à la qualité de l'eau utilisée pour préparer les diverses solutions de la trousse. Ainsi, il ne faut pas utiliser d'eau susceptible de contenir des agents oxydants (hypochlorite de soude) ou des sels de métaux lourds car ils pourraient réagir avec le chromogène.
- Ecarter les solutions contaminées par des bactéries ou des champignons.
- La solution d'arrêt contient de l'acide phosphorique 1 M. Manipuler ce produit avec prudence.
- Le matériel utilisé qui a été en contact avec les échantillons doit être considéré comme potentiellement infectieux et être éliminé en respectant la législation en vigueur du pays.

- Pour garantir la fiabilité des résultats, il importe de respecter parfaitement le protocole. On veillera particulièrement à respecter les temps et les températures d'incubation ainsi que la précision des volumes et des dilutions.

VI – MODE OPERATOIRE

1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation. Retirer la microplaque de son emballage.

2- PREPARATION ET DILUTION DES ECHANTILLONS

2.1- Préparation des sérums sanguins et des plasmas.
Les sérums sanguins ou les plasmas doivent être dilués au 1/100. Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou renfermant des coagula.

2.1.1- Dilution en tube
Distribuer 990 µl de tampon de dilution, préparé suivant les modalités décrites au chapitre "composition de la trousse" dans des tubes de 5 ou de 10 ml. Ajouter dans chacun de ces tubes 10 µl des échantillons et agiter brièvement sur un agitateur mécanique (dilution finale au 1/100).

2.1.2- Dilution en microplaque
Distribuer 20 µl de chacun des échantillons dans les micropuits d'une plaque de dilution. Ajouter 180 µl de tampon de dilution. Mélanger 5 fois par aspiration-refoulement ou par agitation orbitale (dilution au 1/10). Distribuer 90 µl de tampon de dilution dans la microplaque de la trousse. Transférer 10 µl des échantillons prédilués au 1/10. Mélanger 5 fois par aspiration-refoulement ou par agitation orbitale (dilution finale : 1/100).

2.2- Dilution des sérums de référence de la trousse (positif et négatif) et du traceur
Les sérums positif et négatif ainsi que le traceur doivent être dilués au 1/100 dans le tampon de dilution. Réaliser cette dilution en une étape en tube (voir point 2.1.1) ou en deux étapes en microplaque de dilution (voir point 2.1.2).

2.3 Préparation des laits.
Préparer les laits de la façon suivante : centrifuger 20 minutes à 4000 g. Au travers de la couche supérieure de crème et à l'aide d'une pipette Pasteur en verre, prélever le liquide intermédiaire en veillant à ne pas toucher le culot cellulaire sous-jacent.
Les laits ainsi préparés sont utilisés sans dilution.

3- Distribuer les échantillons à raison de 100 µl par puits. Une cupule par échantillon. A titre indicatif, on peut appliquer la disposition suivante : sérum positif : puits A1, sérum négatif : puits A2, traceur : puits A3, échantillon 1: puits A4, échantillon 2 : puits A5 etc...
Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant une heure.

4- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée selon les modalités définies au chapitre "composition de la trousse". Pour ce faire, éliminer le contenu de la microplaque en la retournant vigoureusement au-dessus d'un récipient contenant un agent inactivant. Egoutter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. Ajouter 300 µl de la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus du récipient de confinement. Répéter deux fois toute l'opération en évitant tout particulièrement la formation de bulles dans les cupules. A l'issue de ces 3 lavages, passer au point suivant.
L'utilisation d'un laveur de plaques (automatique ou manuel) est également conseillée. Il est cependant nécessaire de régler la profondeur d'immersion des aiguilles de manière à ne pas altérer la couche de réactifs adsorbés sur le fond des puits.

5- Diluer au 1/50 le conjugué dans le tampon de dilution (par exemple pour une plaque, diluer 250 µl de la solution mère de conjugué dans 12,25 ml de solution de dilution).
Ajouter dans chaque puits utilisé, 100 µl du conjugué. Couvrir et incuber la plaque1 heure à 21°C +/- 3°C.

6- Laver la plaque comme décrit au point 4.

7- Distribuer le TMB sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution doit être parfaitement incolore. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution par de la peroxydase. Si cette éventualité se présente, la solution doit être éliminée et du nouveau TMB doit être prélevé avec du matériel parfaitement propre.

8- Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C à l'obscurité et sans couvrir.
Ce temps n'est donné qu'à titre indicatif car dans certaines circonstances, il pourra être utile de l'allonger ou de le raccourcir.
9- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
10-Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm. Les résultats doivent être enregistrés le plus rapidement possible après l'application de la solution d'arrêt. En effet, en cas de signal élevé, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées.

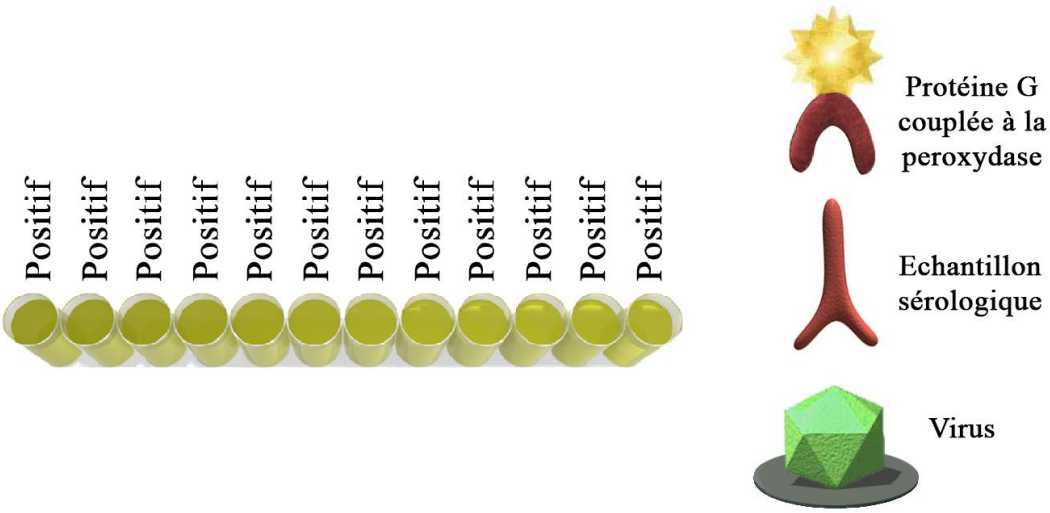
VII – INTERPRETATION DES RESULTATS

Le test ne peut être **validé** que si la différence de densité optique entre le sérum positif et le sérum négatif (DO sérum positif – DO sérum négatif) fournit une valeur en dix minutes supérieure à 0,700 et le sérum négatif une densité optique inférieure à 0,300.

Calculer pour chaque sérum son coefficient en appliquant la formule suivante :

$$\text{Coef éch} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO sérum négatif}}{\text{DO sérum positif} - \text{DO sérum négatif}} \times 100$$

Un échantillon est négatif si son coefficient est inférieur à 30%
Un échantillon est positif si son coefficient est supérieur ou égal à 30 %

VIII – POUR COMMANDER

Monoscreen AbELISA BoHV-4:	1 X 96 tests	BIO K 312/1
	2 X 96 tests	BIO K 312/2