ADENOVIRUS BOVIN DE TYPE 3

Test ELISA pour le diagnostic sérologique de l'adenovirus 3 bovin
Test indirect pour sérums sanguins, plasmas et laits
Test diagnostique pour bovins
Bicupule

I - INTRODUCTION

Jusqu'à présent, les adénovirus bovins sont classés en 9 sérotypes. Ces 9 sérotypes sont divisés en deux sous-groupes en se basant principalement sur le critère de leur réplication soit sur des cellules rénales de veau ou sur des cellules testiculaires (sous-groupe I, sérotypes 1 à 3 et 9) soit uniquement sur des cellules testiculaires (sous-groupe II, sérotypes 4 à 8). Les adénovirus faisant partie du sous-groupe II sont en effet incapables de croître sur des cellules rénales établies de bovins.
Ces deux sous-groupes diffèrent également quant à leurs propriétés antigéniques. La distribution des adénovirus au sein des populations de bovidés est mondiale. Des analyses sérologiques suggèrent que l'infection par les adénovirus est très fréquente chez les bovins. On retrouve fréquemment des traces d'infection par les adénovirus dans les troupeaux de grande taille. Les virus sont excrétés par diverses voies et notamment par la toux. Les infections se produisent préférentiellement chez des veaux âgés de 3 semaines à 4 mois. Chez les animaux atteints, on peut observer des symptômes respiratoires et digestifs, de la fièvre et de l'anorexie. La maladie débute usuellement par des symptômes respiratoires. Le jetage séreux et la conjonctivite sont accompagnés par de la toux. L'atteinte digestive se traduit par de la salivation et par l'émission de selles jaunâtres ou grisâtres. La maladie peut être compliquée par une infection bactérienne secondaire. Le diagnostic des infections par des adénovirus passe obligatoirement par l'analyse, en ELISA, de sérums couplés. S'il n'y a pas d'atteintes aiguës des animaux mais que l'on suspecte une infection du cheptel, une enquête sérologique peut être réalisée. Dans ce cas, un échantillon unique de sérum sanguin sera prélevé sur 5 à 10 % des animaux adultes du cheptel et cet échantillon sera analysé en ELISA. La trousse Bio-X adénovirus bovin 3 est spécifique du sous-groupe I. Elle ne peut mettre en évidence une réponse d'un bovin que vis-à-vis des sérotypes 1, 3 et 9.

II - PRINCIPE DU TEST

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique d'un déterminant antigénique de l'adénovirus 3. Cet anticorps assure la capture du virus en même temps que sa purification à partir du lysat des cellules qui ont servi à sa croissance. Les colonnes impaires (1,3,5,7,9,11) des microplaques contiennent le virus tandis que les colonnes paires (2,4,6,8,10,12) renferment un lysat de cellules rénales bovines non infectées identiques à celles qui ont servi de substrat pour la multiplication du virus. On dispose de la sorte d'un témoin négatif qui permet de différencier les anticorps spécifiques du virus des anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques des cellules rénales qui ont servi à la multiplication virale. L'utilisation d'un tel témoin permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les sérums sanguins, les plasmas et les laits sont dilués dans le tampon de dilution. Après incubation et lavage de la préparation, le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique des IgG1 bovines couplé à la peroxydase, est

ajouté. 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 est plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et ne présente pas de propriétés cancérigènes. En cas de présence d'immunoglobulines spécifiques de l'adénovirus 3 dans le sérum, le plasma ou dans le lait, le conjugué reste fixé dans 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. Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée par le milieu de culture est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'antigène viral. Il est possible de quantifier la réactivité des sérums inconnus suivant une échelle de positivité comprise entre 0 et +++++.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : 2 microplaques de 96 puits. Les colonnes impaires (1, 3, 5, 7, 9, 11) sont sensibilisées par l'antigène viral (adénovirus 3) et les colonnes paires (2, 4, 6, 8, 10, 12) par le lysat cellulaire.
- **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, des laits 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 0,5 ml de conjugué anti-immunoglobulines de bovin couplé à la peroxydase (anticorps monoclonal anti-IgG1 bovines couplé 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. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
  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 25 ml 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 15 ml de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique (H3PO4) 1 M.

	BIO K 063/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5X)
Conjugué	1 X 0,5 ml (50 X)
Sérum positif	1 X 0,5 ml (1 X)
Sérum négatif	1 X 0,5 ml (1 X)
Traceur	1 X 0,5 ml (1 X)
Solution TMB monocomposant	1 X 25 ml (1 X)
Solution d'arrêt	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 doivent être dilués au 1/4.

2.3.1- Dilution en tube
Distribuer 750 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 250 µl des laits et agiter brièvement sur un agitateur mécanique (dilution finale au 1/4).

2.3.2 – Dilution en microplaque

Distribuer 60 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 1/4). Transférer 100 µl des échantillons dilués dans la microplaque de la trousse.

3- Distribuer les échantillons (sérum sanguin, plasma ou lait) à raison de 100 µl par puits. A titre indicatif, on peut appliquer la disposition suivante : sérum positif: puits A1 et A2, sérum négatif: puits B1 et B2, traceur : puits C1 et C2, échantillon 1 : puits D1 et D2...
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). Distribuer la solution diluée de conjugué à raison de 100 µl par puits.
Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant une heure.

6- Laver la plaque comme décrit au point 4.

7- Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution de révélateur doit être parfaitement incolore lors de la distribution sur la plaque. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution ou de la pipette.

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

Soustraire de chaque valeur enregistrée sur les colonnes impaires le signal des puits témoins négatifs correspondants et noter le résultat obtenu (calcul des delta D.O.). Pour effectuer ce calcul, tenir compte de l'existence éventuelle de valeurs négatives. Procéder de même pour les sérums positif et négatif. Le test ne peut être **validé** que si le sérum positif fournit une différence de densité optique en dix minutes supérieure à 0,600 et le sérum négatif une différence de densité optique inférieure à 0,200.

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue avec le sérum positif et multiplier ce résultat par 100 pour l'exprimer sous la forme d'un pourcentage.

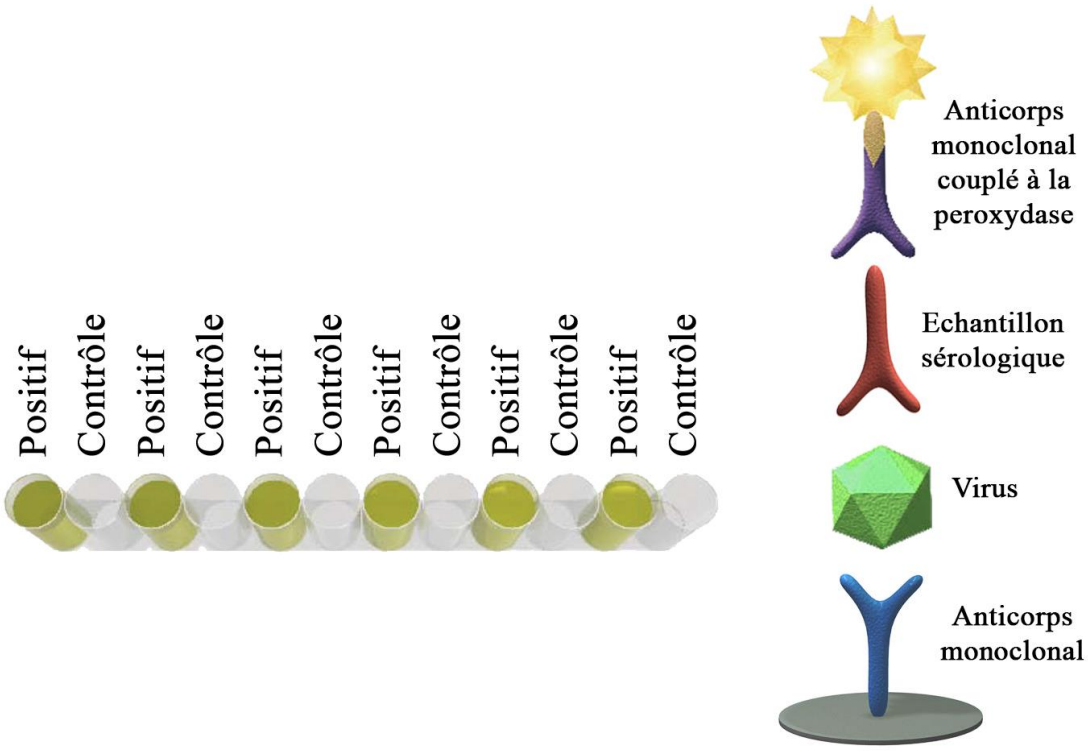
$$\text{Val(eur)} = \frac{\text{Delta DO éch} * 100}{\text{Delta DO pos}}$$

En utilisant le tableau ci-dessous, déterminer le niveau de positivité des sérums, des plasmas ou des laits.

0		+		++		+++		++++		+++++
Val <=	10 %	< Val <=	33 %	< Val <=	56 %	< Val <=	79 %	< Val <=	102 %	< Val

Seule la mise en évidence d'une séroconversion franche réalisée à partir de deux échantillons sériques couplés prélevés à 2-3 semaines d'intervalle peut fournir un diagnostic fiable. Le premier prélèvement devra être effectué

durant la phase aiguë de l'affection. On considère qu'il y a séroconversion franche lorsqu'il y a un accroissement du signal de 2 croix (par exemple : ++ -> ++++ ou + -> +++).
Un échantillon doit être considéré comme **positif** s'il fournit un résultat **supérieur ou égal à une croix (+).**

VIII – POUR COMMANDER

Monoscreen AbELISA Adenovirus bovin de type 3: 2 X 48 tests BIO K 063/2