



# MONOSCREEN<sup>®</sup> Ab ELISA

## BVDV (EO)

Test ELISA pour le diagnostic sérologique  
du virus de la diarrhée virale bovine  
Test de blocage pour sérums sanguins et plasmas  
Test diagnostique pour bovins  
Monocupule

### **I - INTRODUCTION**

Le BVD (bovine virus diarrhoea) et la maladie des muqueuses (MD) sont deux entités cliniques différentes causées par un même virus. Le BVD est le résultat d'une infection aiguë d'animaux susceptibles qui peut survenir à n'importe quel âge de la vie post-natale. La mortalité du BVD est faible, l'affection étant de courte durée. A l'opposé, la maladie des muqueuses est une affection de faible morbidité mais dont la mortalité est très importante. Cette maladie des muqueuses se développe chez des animaux virémiques contaminés *in utero*. La caractéristique de cette infection *in utero* est l'existence d'une immunotolérance spécifique qui empêche les animaux de produire des anticorps contre la souche infectante mais pas contre une autre souche de BVD antigéniquement différente. Ces animaux infectés de façon persistante par le virus peuvent ne pas développer de signes cliniques pendant une très longue période et la seule manière de les détecter est d'avoir recours à des tests de laboratoire. Bien que la seule méthode valable de détection de ces animaux infectés de façon persistante reste la mise en évidence du virus BVD lui-même, il est possible d'avoir recours à un test sérologique pour éviter de devoir soumettre tous les animaux d'une exploitation à un test de mise en évidence du virus BVD à partir de leucocytes. C'est en effet parmi les animaux parfaitement séronégatifs qu'il y a le plus de chance de trouver des animaux infectés de façon persistante. Il ne faut toutefois pas oublier qu'on peut également trouver dans ce groupe des animaux qui n'ont jamais été en contact avec le virus. Les tests sérologiques permettent également de suivre l'évolution sérologique des animaux en cours de vaccination et d'identifier les animaux contaminés par le virus BVD en suivant leur séroconversion.

Comme il s'agit d'un test de blocage, il peut être utilisé chez toutes les espèces animales.

### **II - PRINCIPE DU TEST**

Les microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique de la protéine E0 du virus BVD. Cet anticorps est utilisé pour purifier la protéine à partir d'un lysat de cellules infectées par du baculovirus recombinant E0. L'utilisateur de la trousse dépose dans les cupules de la microplaque les sérums sanguins et les plasmas à tester préalablement dilués. Après une incubation de 2 heures et une étape de rinçage, il ajoute le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique de la protéine E0 du virus BVD couplé à la peroxydase. Après incubation et lavage de la préparation, il 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. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle au titre sérique de l'échantillon. Des sérums de contrôle positif et négatif sont fournis avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

### III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques** : microplaques de 96 puits (12 X 8). L'entièreté des microplaques est sensibilisée avec la protéine virale E0 du virus BVDV.
- **Solution de lavage** : flacon de solution de lavage concentrée 20 fois. La solution cristallise spontanément à froid. En cas d'utilisation partielle de la solution, amener le flacon à 21°C +/- 3°C de façon à ce que tous les cristaux disparaissent; bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire. Diluer 20 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
- **Tampon de dilution** : flacon de tampon de dilution coloré, concentré 5X.  
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. Conserver la solution entre +2°C et + 8°C.
- **Conjugué** : 1 flacon de conjugué anti- protéine E0 du virus BVD: (anticorps monoclonal anti-protéine E0 du virus BVD couplé à la peroxydase de raifort).
- **Sérum positif** : flacon contenant le sérum positif. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
- **Sérum négatif** : flacon contenant le sérum négatif. Conserver ce réactif entre +2°C et +8°C.
- **Solution de TMB monocomposant** : 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** : flacon de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 283/2	BIO K 283/5
Microplaques	2	5
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)	1 X 250 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 30 ml (5X)	1 X 30 ml (5X)
Conjugué	1 X 0,5 ml (50 X)	1 X 1,4 ml (50 X)
Sérum positif	1 X 0,5 ml (1 X)	2 X 0,5 ml (1 X)
Sérum négatif	1 X 0,5 ml (1 X)	2 X 0,5 ml (1 X)
Solution TMB monocomposant	1 X 25 ml (1 X)	1 X 55 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 X 15 ml (1 X)	1 X 30 ml (1 X)

### IV- MATERIEL SUPPLEMENTAIRE ET EQUIPEMENTS REQUIS

Eau distillée, cylindres gradués, Bêchers, tubes en plastic, portoir pour tubes, 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 trousse.
- 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  
Les sérums sanguins ou les plasmas doivent être dilués au 1/2. Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou renfermant des coagula.  
Déposer 50µl de tampon de dilution directement dans la microplaque de la trousse. Ajouter dans chacun des puits 50µl de chaque échantillon. Procéder de la même manière pour les sérums de référence (sérums positif et négatif). Incuber 2 heures à 37°C avec couvercle.
- 3- 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.
- 4- 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. Incuber la plaque à 37°C durant ½ heure avec couvercle.
- 5- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage comme décrit au point 3
- 6- 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.
- 7- Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C et à l'abri de la lumière, 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.
- 8- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 9- 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 (10min). En effet, en cas de signal élevé, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées.

## **VII – CALCUL DES RESULTATS**

Mesurer les densités optiques des sérums positif et négatif (DO pos et DO nég) ainsi que celles de tous les échantillons (DO échantillon).

Pour chaque échantillon testé et pour le sérum positif, calculer le pourcentage d'inhibition (%inh) en appliquant les formules suivantes :

$$\% \text{ inh échantillon} = [(DO \text{ nég} - DO \text{ échantillon}) / DO \text{ nég}] * 100$$

$$\% \text{ inh positif} = [(DO \text{ nég} - DO \text{ pos}) / DO \text{ nég}] * 100$$

## **VIII – VALIDATION DU TEST**

Le test ne peut être validé que si les deux conditions suivantes sont remplies :

- DO nég – DO pos > 0,7
- % inh positif > 50 %

## IX – INTERPRETATION DES RESULTATS

Déterminer le niveau de positivité des échantillons en utilisant le cut-off suivant :

% inhibition > ou = à 50 % : positif

% inhibition < à 50 % : négatif

## X – POUR COMMANDER

Monoscreen AbELISA BVDV (EO):	2 X 96 tests	BIO K 283/2
	5 X 96 tests	BIO K 283/5

