



TROUSSE ELISA BVDV

Pour sérums ou laits (Bovins) - bicupule

BIO K 004/2 - BIO K 004/5

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 déceler 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.

Protocole du test

- 1- L'anticorps monoclonal est fixé sur la microplaque et il capture le virus inactivé.
- 2- Ajouter les échantillons et le contrôle positif.
Incuber 1 heure à 21°C +/- 3°C.
Laver la plaque
- 3- Ajouter le conjugué.
Incuber 1 heure à 21°C +/- 3°C.
Laver la plaque
- 4- Ajouter le TMB
Attendre 10 minutes
Ajouter la solution d'arrêt. Lire à 450 nm



Utilisation de la trousse

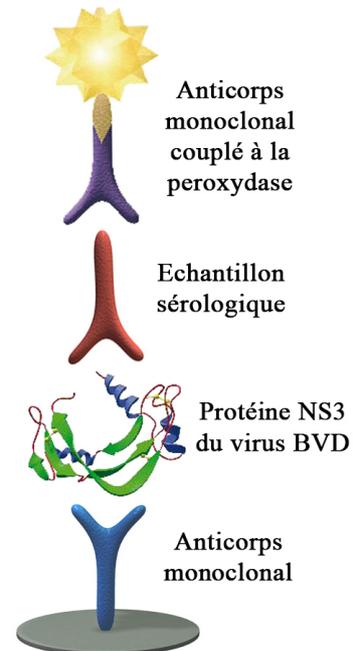
La trousse est prévue pour suivre les séroconversions sur des échantillons pairés ou évaluer le statut sérologique de sérums ou de laits.

Fiabilité des résultats

L'utilisation d'un anticorps monoclonal comme conjugué assure une excellente spécificité et des résultats très fiables. L'utilisation d'un anticorps monoclonal pour purifier la protéine NS3 sur la plaque permet également d'obtenir une excellente spécificité.

Facilité d'utilisation

Peu de manipulations sont nécessaires.
Incubation à température ambiante.
Résultats disponibles en maximum 140 minutes.





Performances de la trousse

270 sérums sanguins ont fait l'objet d'une comparaison entre la trousse BIO K 004 (test d'immunocapture) et un test ELISA de blocage (BIO K 230).

Les résultats figurent dans le graphique n° 1.

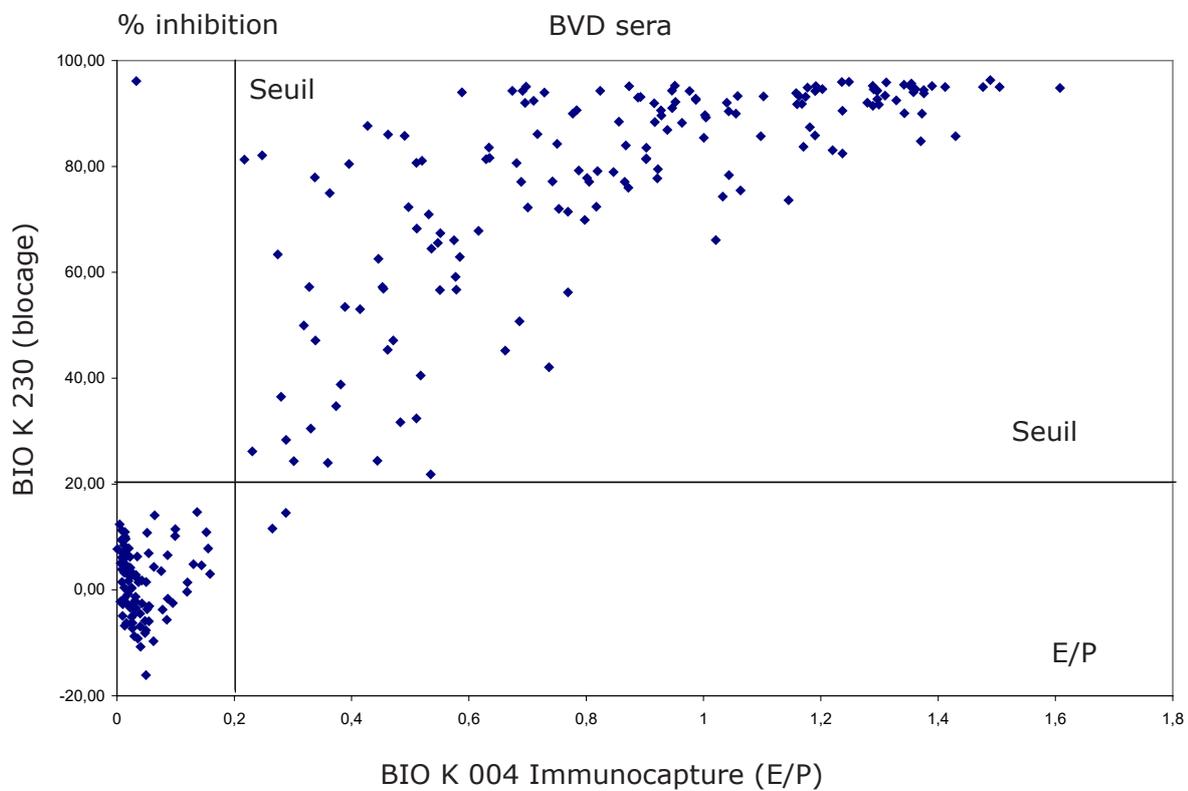
Sur l'abscisse, 1 indique la valeur obtenue avec le sérum positif de référence de la trousse (E/P). Sur l'ordonnée, les valeurs sont données en pourcentage d'inhibition calculé en appliquant la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = (\text{DO négatif} - \text{DO échantillon}) / \text{DO négatif}$$

DO négatif: densité optique obtenue sans sérum sanguin compétiteur

Graphique n° 1

BVBV Immunocapture - Blocage



BIO K 230

BIO K 004		-	+	
	-	105	1	106
	+	2	162	164
		107	163	270

Concordance entre les deux tests: Kappa = 0,98

La concordance entre les 2 tests est estimée excellente

Landis et Koch, The measurement of observer agreement for categorical data

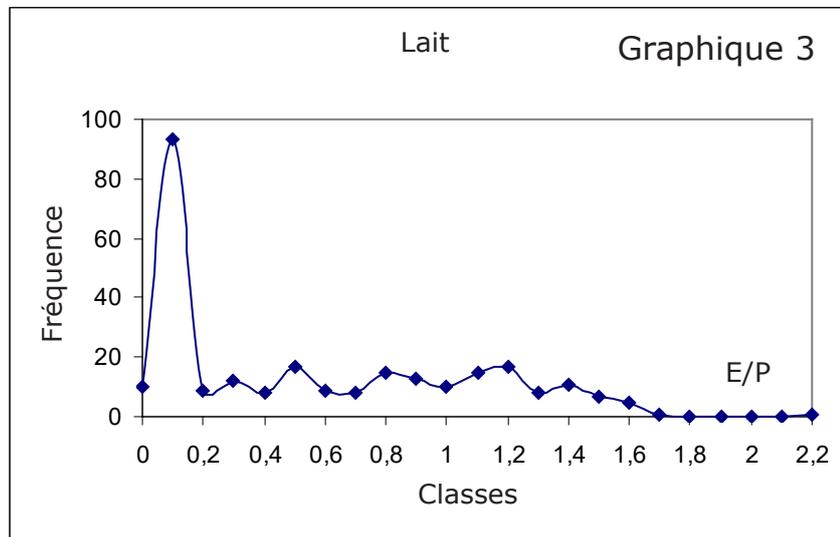
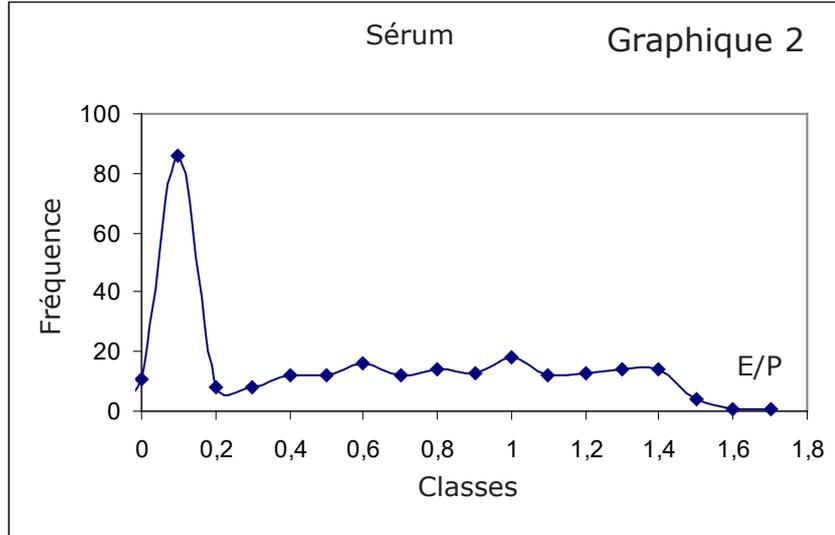
Biometrics 1977, 33, 159-74





Exemple de résultats

270 sérums et 270 laits provenant des mêmes animaux ont été testés à l'aide de la trousse BIO K 004. Ces échantillons sont issus de 27 fermes belges. Les densités optiques obtenues ont été divisées par la densité optique fournie par le sérum de référence de la trousse (E/P). Un histogramme de fréquence a été tracé pour les sérums sanguins (graphe 2) et pour les laits (graphe 3).

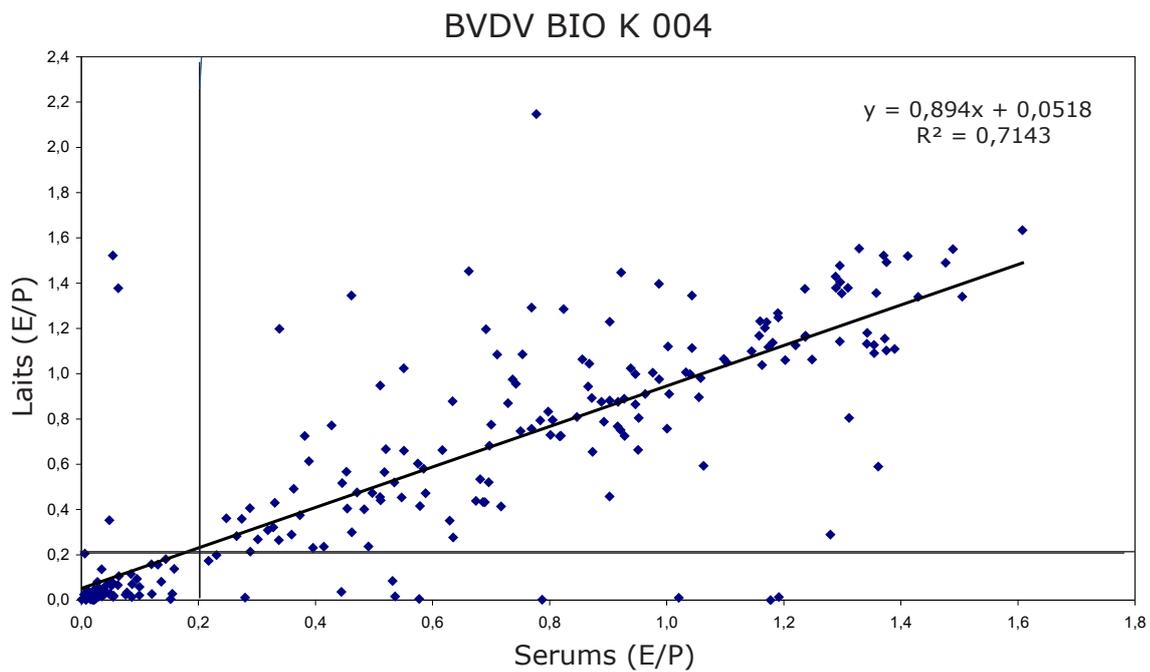




Les histogrammes de fréquence tracés à partir des 270 échantillons de laits et de sérums sanguins permettent de déterminer que les seuils doivent préférentiellement être fixés à 20 % du signal obtenu avec le sérum de référence de la trousse.

Le graphique 4 montre la corrélation entre les résultats sérologiques obtenus avec les sérums sanguins et avec les laits

Graphique 4



Laits

	-	+	
Sérums			
-	101	5	106
+	12	152	164
	113	157	270

Concordance entre les deux tests: Kappa = 0,87

La concordance entre les 2 tests est estimée excellente

Landis et Koch, The measurement of observer agreement for categorical data

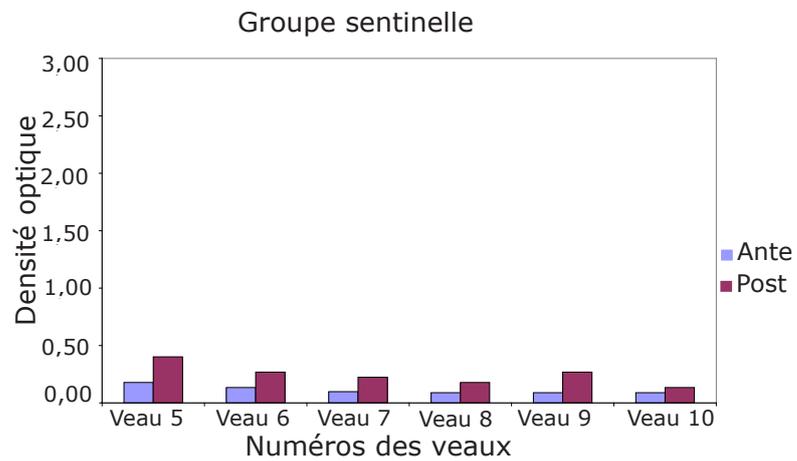
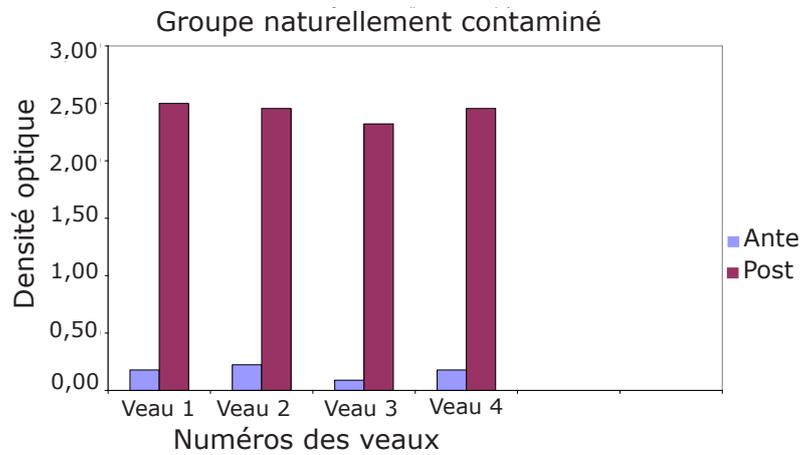
Biometrics 1977, 33, 159-74





Suite au contact avec un animal immunotolérant, un groupe de 4 veaux âgés de 3 à 5 mois a présenté une séroconversion naturelle. Un groupe sentinelle de 6 animaux âgés de 3 à 9 mois a servi de témoin. Les sérums de ces 10 veaux ont été prélevés à 3 semaines d'intervalle. Les échantillons sériques ont été testés avec la trousse sérologique BIO K 004

Graphique n° 5





Un ring test réalisé à l'initiative du FLI (Friedrich-Loeffler-Institut) en Pologne a montré que la trousse BIO K 230 permettait d'obtenir des résultats en parfaite concordance avec ceux attendus.

Laboratoire	Labo32	Labo33		Labo34		Labo35	Labo36	Labo38	Labo39		Labo40	Labo41	
Kits	Kit A	Kit B	Kit C	Kit D	Kit E	Kit D	Kit A	Kit A	Kit B	Kit E	Kit A	Biox K 004	Biox K230
A1	POS	+/-	POS	Neg	Neg	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	+/-
A2	POS	POS	POS	+/-	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
A3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
A4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A5	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
A6	POS	+/-	POS	POS	Neg	POS	POS	POS	+/-	POS	POS	POS	POS
A7	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
A8	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A14	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A15	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
A16	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
A17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A18	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
A19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A20	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS
A21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A22	NEG	+/-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
A23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

A12 : Plasma

 Résultat divergent





Echantillons Ring test BVDV

- A1 : NRL - Sérum standard BVD - réf. 3
BVDV2 - Antisérums ; Titre neutralisant 1:64 contre CS8644, Sérum de référence faiblement positif en ELISA.
- A2 : NRL - Sérum standard BVD - réf. 2BVDV1 - Sérum immun ; Titre neutralisant 1:64 contre NADL, Sérum de référence faiblement positif en ELISA.
- A3 : NRL - Sérum standard BVD - réf. 1
BVDV1 Antisérums ; Titre neutralisant 1:256 contre NADL, Sérum de référence fortement positif en ELISA.
- A4 : Sérum de terrain, antigène négatif et anticorps anti-BVDV négatifs.
- A5 : Sérum de terrain - anticorps anti-BVDV1 positif - Titre neutralisant > 1:256 (NADL).
- A6 : Sérum d'un jeune veau hyperimmunisé à l'aide d'une souche BVDV2 inactivée. (Isolat Bure).
- A7 : Sérum d'un jeune veau hyperimmunisé à l'aide d'une souche BVDV1 inactivée; (NADL).
- A8 : Sérum d'un bovin immunotolérant (IPI) de 4 mois (BVDV1).
- A9 : Sérum A8 dilué au 1:10 dans du sérum de veau nouveau-né (NCS) BVDV négatif.
- A10 : Sérum A8 dilué au 1:100 dans du sérum de veau nouveau-né (NCS) BVDV négatif.
- A11 : Sérum A8 dilué au 1:1000 dans du sérum de veau nouveau-né (NCS) BVDV négatif.
- A12 : Plasma d'un taureau immunotolérant (IPI) (BVDV1).
- A13 : Lot de sérum de veau foetal (P57) ; PCR positif (faible quantité d'ARN ct~38), anticorps négatifs.
- A14 : Lot de sérum de veau foetal (P64) ; PCR négatif, faiblement positif pour certains protocoles avec un faible titre en anticorps (1:4).
- A15 : Sérum d'un animal immunotolérant (IPI) de 4 mois (A8), dilué au 1/100 dans un sérum immun BVDV1.
- A16 : Sérum d'un animal immunotolérant (IPI) de 4 mois (A8), dilué au 1/1000 dans un sérum immun BVDV1.
- A17 : Sérum négatif Alma provenant de la banque cellulaire du FLI Riems.
- A18 : Sérum d'un animal immunotolérant (IPI) de 4 mois (A8), dilué au 1/10 dans un sérum immun BVDV1.
- A19 : Sérum négatif Berta provenant de la banque cellulaire du FLI Riems.
- A20 : Sérum d'un animal immunotolérant (IPI) faiblement positif en anticorps anti-BVDV1.
- A21 : Sérum d'un bovin immunotolérant (IPI), BVDV1.
- A22 : Sérum d'un bovin immunotolérant (IPI), BVDV1.
- A23 : Lot de sérum de veau nouveau-né B00805-0335 (diluants des échantillons A9 à A11)
- NLR : National Reference Laboratory



La trousse BIO K 230 a fait l'objet d'une évaluation par le laboratoire départemental d'analyses de Rennes en 2008.
Les résultats de ces investigations sont repris dans le tableau suivant :

N° serum	N° échantillon	DO	Résultat du laboratoire	Interprétation du laboratoire	Statut réel	Résultat attendu
3	8227	1.693	1.6	Négatif	Négatif	Négatif
5	6852	1.672	2.8	Négatif	Négatif	Négatif
31	1884	1.749	-1.7	Négatif	Négatif	Négatif
33	6017	1.718	0.1	Négatif	Négatif	Négatif
34	4647	0.091	94.7	Positif	Positif	Positif
34	7312	0.096	94.4	Positif	Positif	Positif
36	5209	0.241	86.0	Positif	Positif	Pos/Dtx/Nég
37	1280	0.161	90.6	Positif	Positif	Positif
38	9436	0.195	88.7	Positif	Positif	Positif
39	9514	0.164	90.5	Positif	Positif	Positif
34 au 1/10	4175	0.955	44.5	Positif		Pos/Dtx/Nég
34 au 1/10	8748	0.634	63.1	Positif		Pos/Dtx/Nég
34 au 1/100	1146	1.765	-2.6	Négatif		Pos/Dtx/Nég
34 au 1/100	1159	1.694	1.5	Négatif		Pos/Dtx/Nég
PR	2706	1.604	6.7	Négatif	Négatif	Négatif

Etude de la spécificité : 5 négatifs sur 5 : La spécificité est satisfaisante.
Etude de la sensibilité : 6 positifs sur 6 : La sensibilité est satisfaisante.

Etude de la loi dose-effet avec les sérums 34, 34 au 1/10 et 34 au 1/100 :
La loi dose-effet est vérifiée.





La trousse BIO K 230 a fait l'objet d'une évaluation par l'ANSES Laboratoire de Sophia-Antipolis (unité de pathologie des ruminants) en 2012.
Les résultats de ces investigations sont repris dans le tableau suivant :

Code de l'échantillon	Identité de l'échantillon	Résultats attendus	Résultats observés	Paramètre évalué
19	3	Négatif	Négatif	SP
32	25	Négatif	Négatif	SP
65	31	Négatif	Négatif	SP
8	35	Négatif	Négatif	SP
54	54/53	Négatif	Négatif	SP
79	34 au 1/10	Pos/Dtx/Nég	Positif	CD
4	34 au 1/10	Pos/Dtx/Nég	Positif	CD
71	34 au 1/10	Pos/Dtx/Nég	Positif	CD
13	34 au 1/10	Pos/Dtx/Nég	Positif	CD
59	34 au 1/10	Pos/Dtx/Nég	Positif	CD
43	34 au 1/100	Négatif	Négatif	CD
48	30	Positif	Positif	SE
16	34	Positif	Positif	SE/CD
37	36	Positif	Positif	SE
76	38	Positif	Positif	SE
25	56	Positif	Positif	SE

SP : Spécificité : Satisfaisante
 CD : Cohérence : Satisfaisante
 SE : Sensibilité : Satisfaisante
 Résultats : Conforme





Composition de la trousse

BIO K 004 TROUSSE ELISA SEROLOGIQUE BVDV

	BIO K 004/2	BIO K 004/5
Microplaques	2	5
Solution de lavage	1 x 100 ml (20x)	1 x 250 ml (20x)
Solution de dilution	1 x 50 ml (5x)	1 x 100 ml (5x)
Conjugué	1 x 0.5 ml (50x)	1 x 1.4 ml (50x)
Serum positif	1 x 0.5 ml (1x)	1 x 0.5 ml (1x)
TMB Monocomposant	1 x 25 ml	1 x 55 ml
Solution d'arrêt	1 x 15 ml (1x)	1 x 30 ml (1x)

Stabilité: 1 an entre +2°C et + 8°C

