



# MONOSCREEN<sup>Ab</sup> ELISA

## ***Fasciola hepatica***

Test ELISA pour le diagnostic sérologique de la Fasciolose

Test indirect pour sérums sanguins, plasmas et laits

Test diagnostique pour bovins et ovins

Bicupule

### **I - INTRODUCTION**

La Fasciolose ou distomatose, affection dont la distribution est mondiale, est une maladie provoquée par un parasite de la famille des trématodes, *Fasciola hepatica*. L'affection ne se rencontre que dans les fermes où les conditions requises pour la survie et à la multiplication du vecteur sont remplies. Ce dernier est le mollusque *Galba truncatula* ou limnée tronquée qui colonise les prairies humides (points d'abreuvement, ruisseaux, résurgences.). L'oeuf de *Fasciola hepatica* est éliminé via les bouses et se développe dans l'eau pour donner une larve, le miracidium. Après infestation de la limnée et multiplication à l'intérieur de celle-ci, il y a libération de cercaires mobiles qui se fixent sur un support végétal pour donner la forme infestante ou métacercaire. Après ingestion par le bovin, la jeune douve migre au travers du foie puis gagne les canaux biliaires et se met à pondre. L'infestation entraîne une atteinte hépatique grave durant la phase migratoire (fasciolose aiguë, surtout chez le mouton) puis une atteinte plus insidieuse durant la phase biliaire (fasciolose chronique, surtout chez le bovin). L'affection chez le bovin se caractérise surtout par une baisse des performances zootechniques (- 10 % de production laitière, perte de poids), de la diarrhée intermittente, de l'anémie et des troubles de la fertilité. Le diagnostic clinique est difficile, la recherche des oeufs est laborieuse et très peu sensible.

La fasciolose aiguë du mouton est caractérisée par de l'anémie et parfois par des mortalités soudaines tandis que la fasciolose chronique est accompagnée d'anémie, de diminution de la croissance et d'oedèmes.

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

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique d'une protéine de *Fasciola hepatica*. L'anticorps assure la capture et la purification de cette protéine à partir d'un lysat du parasite. Les colonnes impaires (colonnes 1, 3, 5, 7, 9, 11) des microplaques contiennent la protéine parasitaire purifiée capturée par l'anticorps monoclonal tandis que les colonnes paires (colonnes 2, 4, 6, 8, 10, 12) ne contiennent que l'anticorps monoclonal. L'utilisation d'un tel témoin négatif permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les sérums sanguins, les plasmas ou 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 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 de *Fasciola hepatica* dans le sérum, le plasma ou dans le lait, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant le parasite 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 témoin antigénique est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par le trématode. La trousse permet l'analyse de mélanges de 10 sérums ou plasmas individuels. Elle autorise également une analyse de laits de mélange (lait de tank).

### III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques** : microplaques de 96 puits. Les colonnes impaires (1, 3, 5, 7, 9, 11) sont sensibilisées par l'antigène parasitaire et les colonnes paires (2, 4, 6, 8, 10, 12) par l'antigène témoin.
- **Solution de lavage** : 1 flacon 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 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 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. 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 répétées 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 (H3PO4) 1 M.

	BIO K 211/2	BIO K 211/5
Microplaques	2	5
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)	1 X 250 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)	1 X 100 ml (5 X)
Conjugué	1 X 0,5 ml (50 X)	1 X 1,4 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 (1 X)	1 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, 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 dessiccant 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**

#### *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 pré-dilués 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. 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).

#### *2.1- 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.

### *2.1.1- 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).

### *2.1.2 – 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 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). Distribuer la solution diluée de conjugué à raison de 100 µl par puits.  
Couvrir et incuber 1 heure à 21°C +/- 3°C.
- 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 0,800 et le sérum négatif fournit une différence de densité optique inférieure à 0,300.

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 tableau repris ci-dessous, déterminer le niveau de positivité des sérums, des plasmas, des laits, des mélanges de sérums, de plasmas ou des laits de mélange.

	0	+/-	+	++	+++
Echantillon individuel	Val <10%<=	Val <15%<=	Val <45%<=	Val <75%<=	Val
Pool de 10 échantillons	Val <5%<=	Val <15%<=	Val <45%<=	Val <75%<=	Val

***L'interprétation des niveaux de positivité est la suivante:***

- 0: Pas d'infestation par *Fasciola hepatica*
- +/-: Résultat douteux. Refaire le test un mois plus tard
- +: Infestation faible
- ++: Infestation moyenne
- +++ : Forte infestation

Ces niveaux peuvent être utilisés pour une interprétation individuelle c'est-à-dire au niveau de l'animal soit au niveau du troupeau. Il importe toutefois que cette interprétation du statut sérologique de l'animal ou du troupeau soit effectuée par le vétérinaire de la ferme en intégrant les paramètres suivants:

- Saison de l'année (stabilisation ou pâturage)
- Structure du cheptel (lots d'animaux ayant pâturés ou non)
- Traitements douvicides appliqués
- Conditions météorologiques et environnementales (sites à Limnées).

Par exemple il est bien établi que des animaux fortement positifs vont voir leur titre sérique régresser très progressivement après l'application d'un traitement douvicide. Ils peuvent ainsi passer d'un niveau +++ à un niveau + ou négatif en plusieurs mois moyennant le fait d'être protégés de toute nouvelle infestation.

La trousse ELISA *Fasciola hepatica* peut être utilisée pour une analyse de laits de mélange (lait de tank).

**VIII – POUR COMMANDER**

Monoscreen AbELISA <i>Fasciola hepatica</i>	2 X 48 tests	BIO K 211/2
	5 X 48 tests	BIO K 211/5

