



MONOSCREEN[®] Ag ELISA

Fasciola hepatica

Test ELISA pour le diagnostic antigénique de *Fasciola hepatica*

Test sandwich indirect pour matières fécales

Test diagnostique pour bovins et ovins

Bicupule

I - INTRODUCTION

La Fasciolose bovine 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 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 trousse antigénique de Bio-X Diagnostics permet de détecter la présence de coproantigènes dans les matières fécales de bovins infestés. Même en dehors de la période de ponte de la douve, il est possible de retrouver ces coproantigènes dans les selles. Contrairement aux tests sérologiques, la trousse antigénique ne fournira un résultat positif qu'en cas de présence de douves dans les canalicules biliaires.

II - PRINCIPE DU TEST

Les lignes A, C, E, G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps polyclonal spécifique de *Fasciola hepatica*. Cet anticorps assure la capture des coproantigènes à partir des matières fécales. Les autres lignes de ces microplaques (lignes B, D, F, H) ont été sensibilisées avec un anticorps polyclonal non spécifique du parasite. On dispose de la sorte d'un témoin négatif véritable qui permet de déterminer ce qui a été fixé de façon spécifique sur la microplaque. L'utilisation d'un tel témoin permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les matières fécales sont diluées dans le tampon de dilution et incubées durant deux heures sur la microplaque. Après cette incubation, la plaque est rincée et on applique le premier conjugué (un anticorps monoclonal spécifique d'un déterminant antigénique de *Fasciola hepatica* couplé à la biotine), puis la plaque est mise à incuber une heure à 21°C +/- 3°C. Après rinçage, on applique le deuxième conjugué, de l'avidine spécifique de la biotine et couplée à la peroxydase, et on incube une

nouvelle heure à 21°C +/- 3°C. Après une étape de rinçage, on ajoute la solution de révélation (TMB Mono-composant).

En cas de présence de coproantigènes de *Fasciola hepatica*, les conjugués restent fixés dans la cupule correspondante et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en coproantigènes de l'échantillon. Après arrêt de la réaction par une solution acide, la densité optique des échantillons est lue à 450 nm.

Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée avec l'anticorps polyclonal témoin est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'anticorps polyclonal spécifique de *Fasciola hepatica*.

Un antigène contrôle est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus. Cet antigène de contrôle est constitué d'un broyat de douves lyophilisé.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques** : 2 microplaques de 96 puits. Les lignes A, C, E, G sont sensibilisées par l'anticorps spécifique de *Fasciola hepatica* et les lignes B, D, F, H par l'anticorps témoin (anticorps polyclonal non spécifique du parasite).
- **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 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** : 1 flacon de 50 ml de tampon de dilution coloré, concentré 5 fois . En cas d'utilisation partielle, bien mélanger et en prélever le volume nécessaire. Diluer 5 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée. 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 500 µl de conjugué biotiné anti-*Fasciola hepatica* concentré 50 X. Le réactif doit être dilué au 1/50 dans le tampon de dilution.
- **Avidine** : 1 flacon de 500 µl d'avidine couplée à la peroxydase concentré 50 X. Le réactif doit être dilué au 1/50 dans le tampon de dilution.
- **Antigène de contrôle** : 2 flacons contenant l'antigène de contrôle. Reconstituer ce réactif avec 0,5 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Après reconstitution, l'antigène se conserve à -20°C. Répartir ce réactif en deux 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.
- **Solution de TMB mono-composant** : 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 1 M.

	BIO 201/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution	1 X 50 ml (5 X)
Conjugué	1 X 0,5 ml (50 X)
Avidine	1 X 0,5 ml (50 X)
Antigène de contrôle	2 X 0,5 ml (1 X) lyophilisés
Solution TMB mono-composant	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, béciers, 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, agitateur de microplaques, laveur 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.
- 2- Retirer la microplaque de son emballage.
- 3- Diluer les matières fécales dans le tampon de dilution (2 grammes / 2 ml chez le bovin et 0,5 gr / 2 ml chez les ovins). Centrifuger à 1000 g durant 10 minutes et prélever le surnageant.
- 4- Distribuer les échantillons à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante: échantillon 1: puits A1-B1, échantillon 2: puits C1-D1, etc... Procéder de la même manière pour l'antigène de contrôle (ex. G1-H1).
- 5- Incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant 2 heures sur un agitateur pour plaques. Utiliser un couvercle.
- 6- 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 au moins 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.
- 7- Diluer la quantité nécessaire de conjugué biotiné anti-*Fasciola hepatica* au **1:50** dans la solution de dilution des réactifs (20 µl de conjugué + 980 µl de solution de dilution des réactifs, par barrette).
- 8- Distribuer la solution diluée de conjugué anti-*Fasciola* à raison de 100 µl par puits.
- 9- Couvrir et incuber une heure à 21°C +/- 3°C.
- 10- Laver la plaque comme décrit au point 6.
- 11- Le conjugué Avidine peroxydase est liquide et est à diluer au **1:50** dans la solution de dilution des réactifs (20 µl de conjugué + 980 µl de solution de dilution des réactifs, par barrette).
12. Distribuer la solution diluée de conjugué peroxydase à raison de 100 µl par puits.
13. Couvrir et incuber une heure à 21°C +/- 3°C.
14. Laver la plaque comme décrit au point 6.
15. Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution du révélateur doit être parfaitement incolore lors de la distribution sur la microplaque. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution ou de la pipette. Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C sans couvrir et à l'obscurité. Ce temps n'est donné qu'à titre indicatif car dans certaines circonstances, il pourra être utile de l'allonger ou de le raccourcir.
16. Distribuer 50 µl de solution d'arrêt par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
17. A l'aide d'un lecteur de microplaques, enregistrer le plus rapidement possible les densités optiques à 450 nm.

VII – INTERPRETATION DES RESULTATS

Soustraire de chaque valeur enregistrée sur les lignes impaires (A, C, E, G) le signal des puits témoins négatifs correspondants (B, D, F, H) 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 le contrôle positif. Le test ne peut être validé que si la référence positive fournit une différence de densité optique en dix minutes supérieure à la valeur indiquée sur le contrôle de qualité annexé à la notice.

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue avec le contrôle 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 premier tableau repris dans le contrôle de qualité, déterminer le statut des échantillons: (positif ou négatif).

VIII – POUR COMMANDER

Monoscreen AgELISA *Fasciola hepatica*: 2 X 48 tests

BIO K 201/2

