



MONOSCREEN^{Ag} ELISA

BRSV

Test ELISA pour le diagnostic antigénique
du virus respiratoire syncytial bovin
Test sandwich pour lysats pulmonaires
Test diagnostique pour bovins
Bicupule

I - INTRODUCTION

Le BRSV est en Europe, le premier facteur étiologique responsable des affections respiratoires des jeunes bovidés. Il occasionne chez le bétail comme d'ailleurs chez l'enfant, une atteinte de l'arbre respiratoire profond. L'affection produit très souvent des lésions sévères responsables de pertes économiques importantes. Ainsi, on estime qu'en Europe, 7 millions de veaux souffrent chaque année de problèmes infectieux divers parmi lesquels 60 % seraient respiratoires. Un million de veaux meurent chaque année d'affections respiratoires au sein de la Communauté Européenne. Si on tient compte des frais occasionnés par les traitements, par les retards de croissance et les mortalités, la perte totale est estimée à 450 millions d'Euro pour les veaux de moins d'un an. La perte financière occasionnée par le BRSV au veau laitier est de 25 Euro par animal.

Le BRSV touche principalement les jeunes animaux. Le bétail culard paye un lourd tribut à cette affection étant donné le développement important de sa masse musculaire en comparaison de son faible volume pulmonaire. Les manifestations cliniques de l'affection sont la plupart du temps assez sévères. On peut noter habituellement les signes d'une pneumonie sérieuse c'est-à-dire une polypnée accompagnée d'une hyperthermie importante. Les réinfections sont couramment observées mais elles sont la plupart du temps asymptomatiques. Le diagnostic clinique de l'affection est impossible, et il est nécessaire de recourir au laboratoire pour établir un diagnostic précis. Ce dernier peut être effectué par mise en évidence du virus sur une coupe de poumon à l'aide d'un anticorps spécifique couplé à la fluorescéine (immunofluorescence directe). Le diagnostic peut également être posé si on peut déceler une séroconversion nette vis-à-vis du virus. Pour ce faire, il conviendra de prélever un premier échantillon sanguin en phase aiguë de l'affection et d'en prélever un second 2 à 3 semaines plus tard, c'est-à-dire durant la phase de convalescence de l'animal. Ces deux sérums couplés seront évalués quant à leur spécificité vis-à-vis du virus syncytial par un test ELISA. La trousse antigénique BRSV permet de poser un diagnostic à partir d'un broyat de poumon prélevé sur le cadavre.

II - PRINCIPE DU TEST

Les lignes A, C, E, G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps polyclonal spécifique du BRSV. Cet anticorps assure la capture du virus à partir de l'échantillon dans lequel il se trouve (broyat de poumon, milieu de culture). Les autres lignes de ces microplaques (lignes B, D, F, H) ont été sensibilisées avec un anticorps polyclonal non spécifique du virus. 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 échantillons sont dilués dans la solution de lyse et incubés durant une heure sur la microplaque. Après cette incubation, la plaque est rincée et on applique le conjugué (un anticorps monoclonal anti-BRSV couplé à la peroxydase), puis la plaque est mise à incuber une heure à 21°C +/- 3°C. Après rinçage, on ajoute la solution de révélation (TMB mono-composant). 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 du virus dans l'échantillon, le conjugué reste fixé sur 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 virus de l'échantillon. 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 du BRSV. Un contrôle positif est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : 1 microplaque de 96 puits. Les lignes A, C, E, G sont sensibilisées par l'anticorps spécifique du BRSV et les lignes B, D, F, H par l'anticorps témoin.
- **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. Stocker la solution diluée entre +2°C et +8°C.
- **Solution de lyse** : 1 flacon de 100 ml de solution de lyse prêt à l'emploi. En cas d'utilisation partielle, bien mélanger et en prélever le volume nécessaire.
- **Conjugué** : 1 flacon de 12 ml de conjugué anti-BRSV coloré prêt à l'emploi.
- **Contrôle positif** : 1 flacon de 2 ml. Le réactif est prêt à l'emploi
- **Solution de TMB mono-composant** : 1 flacon de 12 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 6 ml de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 336/1
Microplaque	1
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Solution de lyse	1 X 100 ml (1X)
Conjugué	1 X 12 ml (1 X)
Contrôle positif	1 X 2 ml (1 X)
Solution de TMB mono-composant	1 X 12 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 x 6 ml (1 X)

IV- MATERIEL SUPPLEMENTAIRE ET EQUIPEMENTS REQUIS

Eau distillée, cylindres gradués, Béchers, tubes en plastic, portoir pour tubes, pointes, réservoir à réactifs pour pipettes multicanaux, couvercle, adhésif pour microplaques, pipettes automatiques graduées (mono et multicanaux), paire de ciseaux, boîtes de Petri, lecteur de microplaque, laveur et agitateur de microplaques (optionnel), balance.

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 concentrée peut être stockée à température ambiante. Après dilution, cette solution a une stabilité de 6 semaines entre +2°C et +8°C. La solution de lyse peut être stockée à température ambiante.
- 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

A. PREPARATION DES ECHANTILLONS.

1. **Broyats d'organes** : Prélever un échantillon d'environ 1 gramme de tissu pulmonaire. Sélectionner cet échantillon au niveau des lobes apicaux dans une zone présentant des lésions macroscopiques. Eviter de prélever un échantillon dans les régions présentant des lésions d'emphysème car ces territoires ne contiennent en général que peu de particules virales. Déposer le fragment pulmonaire dans 2 ml de solution de lyse dans une boîte de Pétri et le découper en fragments de très petite taille à l'aide d'une paire de ciseaux. Après homogénéisation, transférer le tout dans un tube et centrifuger à 500 g pendant 10 min de manière à décanter les fragments insolubles. Prélever le surnageant pour réaliser le test ELISA.
2. **Culture cellulaire** : Il est possible d'utiliser la trousse antigénique BRSV pour tester la croissance du virus sur des cellules susceptibles (lignées primaires, VERO, HEP2). On peut dans ce cas utiliser directement le milieu de culture pour déposer sur la microplaque.

B. REALISATION DU TEST.

- 1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation.
- 2- Retirer la microplaque de son emballage.
- 3- 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 le contrôle positif (ex. G1-H1).
- 4- Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant 1 heure.
- 5- 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.
- 6- Distribuer le conjugué à raison de 100 µl par puits. Couvrir et incuber la plaque 1 heure à 21°C +/- 3°C.
- 7- Laver la plaque comme décrit au point 5.
- 8- 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 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.
- 9- Distribuer 50 µl de solution d'arrêt par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 10- 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 (B, D, F, H) 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 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 BRSV:

1 X 48 tests

BIO K 336/1

