



MONOSCREEN[®] Ag ELISA

Mycoplasma bovis

Test ELISA pour le diagnostic antigénique de *Mycoplasma bovis*

Test sandwich pour lysats tissulaires et laits

Test diagnostique pour bovins

Bicupule

I - INTRODUCTION

Mycoplasma bovis est associé à de multiples pathologies des bovidés parmi lesquelles des arthrites, des pneumonies du veau et du jeune bétail, des mammites et des infections de la sphère génitale. Les pneumonies infectieuses qui affectent les veaux en élevage intensif sont responsables de pertes économiques importantes à cause des mortalités, des coûts des traitements et des retards de croissance qu'elles occasionnent. Ces affections respiratoires sont souvent plurifactorielles et elles sont causées par des interactions entre des virus, des Mycoplasmes et d'autres bactéries. Plusieurs espèces de Mycoplasmes ont pu être isolées du tractus respiratoire du veau. Certaines sont plus que probablement de simples commensaux ou opportunistes qui ne font qu'étendre les dommages pulmonaires occasionnés par d'autres agents. *Mycoplasma bovis* a été isolé du poumon de veaux atteints de pneumonie et c'est probablement l'espèce la plus pathogène qui touche le bétail exception faite toutefois de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Mycoplasma bovis* peut induire des pneumonies chez des veaux gnotobiotiques. On retrouve fréquemment *Mycoplasma bovis* associé à *Mannheimia haemolytica* lors de pneumonies chez le veau.

II - PRINCIPE DU TEST

Mycoplasma bovis étant présent habituellement en quantités faibles au sein des échantillons pathologiques, il est nécessaire de procéder à un enrichissement sur un milieu adéquat (milieu de Hayflick additionné d'antibiotiques et d'antimycotiques). Après une croissance de 3 jours à 37°C directement sur la microplaque de la trousse, les cultures sont testées afin d'y mettre en évidence la présence de *Mycoplasma bovis*.

Les lignes A, C, E, G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps polyclonal spécifique de *Mycoplasma bovis*. Cet anticorps assure la capture de la bactérie au fur et à mesure qu'elle se développe dans le milieu de culture. Cette technique d'immunoenrichissement permet d'augmenter de façon significative la sensibilité du test. Les autres lignes de ces microplaques (lignes B, D, F, H) ont été sensibilisées avec un anticorps polyclonal non spécifique de la bactérie. 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. Après la culture de 72 H, on lave la préparation et on ajoute le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique de *Mycoplasma bovis* couplé à la peroxydase. Après une incubation d'une heure à 21°C +/- 3°C et d'un second lavage, 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 de la

bactérie dans la culture, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant l'antigène bactérien et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en bactérie 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 de *Mycoplasma bovis*. Un antigène de contrôle est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus. Cet antigène de contrôle est constitué d'une culture de *Mycoplasma bovis* lyophilisée et inactivée.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques** : 2 microplaques de 96 puits. Les lignes A, C, E, G sont sensibilisées par l'anticorps polyclonal spécifique de *Mycoplasma bovis* et les lignes B, D, F, H par l'anticorps témoin (anticorps polyclonal non spécifique de *Mycoplasma bovis*).
- **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.
- **Conjugué** : 1 flacon de 25 ml de conjugué anti-*Mycoplasma bovis* : (anticorps monoclonal anti-*Mycoplasma bovis* couplé à la peroxydase de raifort). Prêt à l'emploi.
- **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. 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.
- **Milieu de Hayflick**: 1 flacon de 30 ml de milieu de culture stérile.
- **Flacons d'antibiotiques et d'antimycotiques**: 2 flacons contenant un mélange d'antibiotiques et d'antimycotiques lyophilisés.

	BIO K 341/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Conjugué	1 X 25 ml (1 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)
Milieu de Hayflick	1 X 30 ml
Flacons d'antibiotiques et d'antimycotiques	2 (lyophilisés)

IV- MATERIEL SUPPLEMENTAIRE ET EQUIPEMENTS REQUIS

Eau distillée, microplaque de dilution stérile, PBS stérile, paire de ciseaux, sachet minigrup, 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. L'antigène de contrôle doit après reconstitution être conservé à -20°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, la solution a 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

Remarque : Il est nécessaire de procéder à une dilution des échantillons (4 dilutions d'ordre 9 par échantillon) car la croissance de germes contaminants aux faibles dilutions peut entraver le développement de *Mycoplasma bovis*. La gamme de dilution proposée (1/9 à 1/6561) permet de couvrir une plage compatible avec le nombre de Mycoplasmes qu'on peut retrouver dans un échantillon pathologique provenant de bovins. D'autre part, il est nécessaire de prévoir deux puits pour chaque dilution puisque la trousse se présente sous un format de type bicupule (cupule test et cupule témoin).

MISE EN CULTURE DES ECHANTILLONS.

- 1- Préparer le milieu d'enrichissement en travaillant de manière stérile. Solubiliser le contenu d'un flacon d'antibiotiques et d'antimycotiques à l'aide de 1 ml de milieu d'enrichissement. Diluer la solution d'antibiotiques dans 12 ml de milieu de Hayflick. Le milieu ainsi préparé est prêt à l'emploi. Sa stabilité n'est que de courte durée (3 jours entre +2°C et +8°C) car les antibiotiques et les antimycotiques sont instables en solution liquide. Le milieu de Hayflick contient du sérum de veau foetal. Sa stabilité est limitée à 6 mois. Il est possible d'obtenir des flacons d'antibiotiques et d'antimycotiques supplémentaires si la trousse est utilisée en plusieurs étapes.
- 2- L'enrichissement peut être réalisé à partir de divers échantillons pathologiques (broyats de poumons, liquide de lavage bronchoalvéolaire, écouvillonnage des cavités nasales, ponctions articulaires, laits, lochies etc...). Les échantillons devront être acheminés au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence entre +2°C et +8°C et dans un milieu de conservation ne contenant pas d'antibiotiques ou de substances susceptibles d'inhiber la croissance de *Mycoplasma bovis*. Pour la préparation de broyat de poumons, procéder de la façon suivante : prélever un fragment pulmonaire d'environ 1 cm³, le déposer dans 10 ml de solution de PBS stérile dans une boîte de Pétri et le découper en fragments de très petites tailles à l'aide d'une paire de ciseaux. Ces équipements et réactifs devront être stérilisés avant et après usage de manière à éviter de contaminer les échantillons. Les poumons peuvent être stockés au congélateur. Les broyats ne peuvent pas être congelés car cela réduit fortement la viabilité des Mycoplasmes.
- 3- Utiliser une microplaque stérile pour réaliser les 4 dilutions de chaque échantillon. Distribuer stérilement dans tous les puits des barrettes utilisées pour tester les échantillons 240 µl de milieu de Hayflick complet à l'aide d'une pipette multicanaux équipée de micropointes stériles. Prévoir 4 micropuits par échantillon. Travailler dans une hotte à flux laminaire ou à côté d'une flamme en respectant les conditions de manipulations stériles. Dans le premier micropuits (A1), ajouter stérilement 30 µl de la solution du premier échantillon dans les 240 µl de milieu en assurant 2 à 3 va-et-vient dans la micropointe (dilution 1/9). Voir schéma. Procéder de même pour les autres échantillons (échantillon 2 en A2, échantillon 3 en A3 etc...). A l'aide d'une pipette multicanaux, transférer 30 µl de la première rangée de dilutions dans le puits de la rangée B (1/81). Bien diluer. Procéder de même pour les puits de la rangée C (1/729) puis pour ceux de la rangée D (1/6561).
- 4- Retirer la microplaque de la trousse de son emballage et prélever le nombre de barrettes nécessaires pour tester les échantillons à évaluer. Prévoir une barrette supplémentaire pour les contrôles. En s'aidant d'une pipette multicanaux et en partant de la plus haute dilution (ligne D), transférer 100 µl des puits de la rangée D de la plaque de dilution vers les puits des rangées H et G de la microplaque ELISA. Procéder de même pour les autres rangées (voir le schéma). Pour la barrette témoin, distribuer le contrôle positif à raison de 100 µl par puits dans les puits A1 et B1. Distribuer dans les puits E1 et F1 100 µl de solution de Hayflick.
- 5- Incuber la microplaque ELISA avec un couvercle durant 3 jours à 37°C dans un sachet minigrp. Ajouter dans ce sachet un dispositif générateur de CO₂ et un papier imbibé d'eau pour éviter la déshydratation du milieu.

Exemple de générateur de CO₂ : CO₂ Gen 2.5L Thermo scientific CD0025A. Il est également possible d'utiliser un incubateur à CO₂ réglé entre 3.5 et 9 %

- 6- A l'issue des 3 jours d'enrichissement, 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.
- 7- Distribuer le conjugué à raison de 100 µl par puits. Couvrir et incuber la plaque 1 heure à 21°C +/- 3°C .
- 8- Laver la plaque comme décrit au point 6.
- 9- 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.
- 10-Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 11-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.

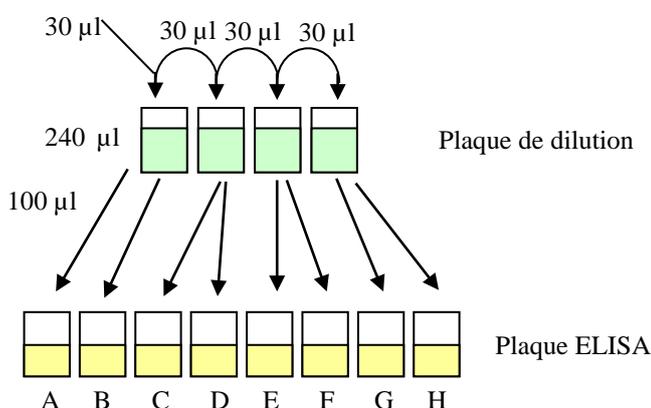
VII – INTERPRETATION DES RESULTATS

Soustraire de chaque valeur enregistrée sur les 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 *Mycoplasma bovis*:

2 X 12 tests

BIO K 341/2

