



MONOSCREEN[®] Ag ELISA

Cryptosporidium parvum

Test ELISA pour le diagnostic antigénique de *Cryptosporidium parvum*

Test sandwich pour matières fécales

Test diagnostique toutes espèces

Bicupule

I - INTRODUCTION

Les diarrhées néonatales sont une cause majeure de mortalités chez le veau de moins d'un mois. Les gastroentérites néonatales sont des pathologies multifactorielles qui peuvent être causées par des virus (rotavirus, coronavirus), par des bactéries (colibacilles entéropathogènes, *salmonella*) ou par des protozoaires tels que *Cryptosporidium parvum*.

Le diagnostic des causes de diarrhée passe obligatoirement par des tests de laboratoire car il n'est pas possible d'identifier l'agent causal sur base de signes cliniques. Il est possible de mettre en évidence *Cryptosporidium parvum* dans les matières fécales de veaux souffrant de diarrhée par la technique de flottaison ou par coloration (Ziehl Neelsen modifié). Ces deux méthodes sont cependant très fastidieuses à mettre en oeuvre lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être analysé. La méthode ELISA est très simple à réaliser. Sa sensibilité et sa spécificité sont très proches de celles obtenues par flottaison ou par coloration.

II - PRINCIPE DU TEST

Les lignes A, C, E, G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique des ookystes de *Cryptosporidium parvum*. Cet anticorps assure la capture du protozoaire à partir de l'échantillon dans lequel il se trouve (matières fécales). Les lignes B, D, F et H, ont été sensibilisées avec un anticorps monoclonal non spécifique du protozoaire. 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 une heure sur la microplaque. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique des ookystes de *Cryptosporidium parvum* couplé à la peroxydase. 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 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 protozoaire dans l'échantillon, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant l'antigène et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en ookystes de l'échantillon. Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée avec l'anticorps monoclonal témoin est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'anticorps monoclonal spécifique du parasite. Un contrôle positif est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : 2 microplaques de 96 puits. Les lignes A, C, E, G sont sensibilisées par l'anticorps spécifique des ookystes de *Cryptosporidium parvum* et les lignes B, D, F, H par l'anticorps témoin (anticorps monoclonal 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 25 ml de conjugué anti-ookystes de *Cryptosporidium parvum* : (anticorps monoclonal anti-ookystes couplé à la peroxydase de raifort). Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Contrôle positif** : 1 flacon de 4 ml. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **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 K 346/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)
Conjugué	1 X 25 ml (1 X)
Antigène de contrôle	1 X 4 ml (1 X)
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, 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. 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 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

- 1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation.
- 2- Retirer la microplaque de son emballage.
- 3- Diluer au demi les matières fécales dans le tampon de dilution (tube à essai). Si la consistance de l'échantillon rend l'homogénéisation difficile, on peut ajouter dans le récipient des billes de verre et déliter la selle en agitant vigoureusement l'ensemble. Ne pas centrifuger.
- 4- Distribuer les échantillons dilués 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 – 100 µl/puits (ex. G1-H1).
- 5- Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant 1 heure.
- 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 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 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 50 µl de solution d'arrêt 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 *Cryptosporidium parvum* :

2 X 48 tests

BIO K 346/2

