



Respiratoire bovin

Test ELISA pour le diagnostic sérologique du
BRSV, BPI3, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia haemolytica* et Adenovirus 3
Test ELISA indirect pour sérums sanguins et plasmas
Test diagnostique pour bovins

I - INTRODUCTION

Les affections respiratoires constituent chez les bovins un problème préoccupant étant donné leur fréquence et le nombre élevé d'animaux qui en souffrent. Ces affections se rencontrent dans tous les pays qui pratiquent un système d'élevage intensif impliquant le regroupement d'un grand nombre d'animaux dans des espaces limités. L'étiologie de ces affections est multi-factorielle, ce qui en complique la pathogénie mais aussi le traitement. Des agents viraux et bactériens en association avec un état de stress provenant soit de déplacements dans des véhicules surpeuplés, soit de maintien des animaux dans des étables mal entretenues ou mal ventilées, jouent un rôle important dans le déclenchement d'affections respiratoires aiguës. Ces affections touchent plus particulièrement les jeunes animaux bien qu'elles puissent également affecter les adultes. Dans la plupart des cas, les animaux souffrant d'affections respiratoires hébergent plusieurs agents pathogènes dont certains agissent en synergie. Ainsi, il est généralement reconnu que les virus sont les premiers agents à intervenir et que les bactéries agissant comme second envahisseur accentuent la pathologie. La fièvre des transports, "shipping fever", est un bel exemple de la synergie d'action qui peut exister au niveau de l'arbre respiratoire entre un virus, le BPI3, et une bactérie comme *Mannheimia haemolytica*.

La trousse ELISA respiratoire de Bio-X permet d'évaluer la réponse immunitaire humorale des bovins contre 5 agents fréquemment impliqués dans ces affections respiratoires. Ces agents sont le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV), le virus parainfluenza 3 (BPI3), l'adénovirus type 3, *Mannheimia haemolytica* et *Mycoplasma bovis*.

II - PRINCIPE DU TEST

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques des trois agents pathogènes (BRSV, BPI3 et adénovirus). Les anticorps assurent la capture et la purification de ces agents à partir du lysat des cellules qui ont servi à leur croissance. Pour *Mycoplasma bovis*, une protéine recombinante exprimée chez *E. coli* est utilisée pour sensibiliser les colonnes correspondantes. Pour *Mannheimia haemolytica* les colonnes correspondantes sont sensibilisées par du lipopolysaccharide (LPS). La répartition sur la microplaque de ces agents est la suivante:

Colonnes 1 et 7: BRSV
 Colonnes 2 et 8: BPI3
 Colonnes 3 et 9: *Mycoplasma bovis*
 Colonnes 4 et 10: *Mannheimia haemolytica*
 Colonnes 5 et 11: Adénovirus 3
 Colonnes 6 et 12: Témoin cellulaire

Les colonnes 6 et 12 contiennent un anticorps monoclonal. L'utilisation d'un tel témoin permet de limiter dans des proportions importantes le nombre de sérums faussement positifs. Les sérums et plasmas à tester sont dilués au 1/100 dans le tampon de dilution et sont incubés durant une heure à 21°C +/- 3°C. 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 cancérogène.

En cas de présence d'immunoglobulines spécifiques dans les échantillons testés, le conjugué reste fixé sur 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 anticorps spécifiques présents dans l'échantillon. Les signaux enregistrés sur les cupules témoins (colonnes 6 et 12) sont retranchés des signaux des cupules positives correspondantes. Il est possible de quantifier la réactivité des sérums inconnus suivant une échelle de positivité comprise entre 0 et +++++.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : microplaques de 96 puits. La répartition des différentes valences est indiquée sur l'enveloppe métallique.
- **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 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.
- **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 369/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)
Conjugué	1 X 0,5 ml (50 X)
Sérum positif	1 X 0,5 ml (1 X)
Sérum négatif	1 X 0,5 ml (1 X)
Solution TMB monocomposant	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, microplaque 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 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. 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 références de la trousse (positif et négatif).

Les sérums positif et négatif doivent être dilués au 1/100 dans le tampon de dilution. 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).

- 3- Distribuer les échantillons dilués au 1/100 à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante: sérum positif: puits H1 à H6, sérum négatif : puits G1 à G6 ; échantillon 1: puits A1 à A6, échantillon 2: puits B1 à B6 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 la plaque 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 puits 1, 2, 3, 4, 5 le signal du puits témoin négatif correspondant (puits 6) et noter le résultat obtenu (calcul des delta D.O.). Pour effectuer ce calcul, tenir compte de l'existence éventuelle de valeurs négatives.

Effectuer les mêmes opérations pour les puits correspondants au sérum positif et au sérum négatif.

Le test ne peut être validé que si le sérum positif fournit une différence de densité optique en dix minutes supérieure pour chaque valence aux valeurs suivantes :

BRSV	>	1,200
BPI3	>	0,800
<i>M. bovis</i>	>	1,200
<i>Mannheimia</i>	>	1,000
ADENO 3	>	1,200

et le sérum négatif, une différence de densité optique en dix minutes inférieure pour chaque valence 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 le tableau ci-dessous, déterminer le niveau de positivité des sérums et des plasmas.

	0		+		++		+++		++++		+++++
BRSV	Val <=	20 %	< Val <=	41 %	< Val <=	62 %	< Val <=	84 %	< Val <=	105 %	< Val
BPI3	Val <=	30 %	< Val <=	59 %	< Val <=	88 %	< Val <=	116 %	< Val <=	145 %	< Val
<i>M. bovis</i>	Val <=	66 %	< Val <=	85 %	< Val <=	103 %	< Val <=	122 %	< Val <=	140 %	< Val
Man. haemo	Val <=	20 %	< Val <=	40 %	< Val <=	60 %	< Val <=	80 %	< Val <=	100 %	< Val
ADENO 3	Val <=	20 %	< Val <=	40 %	< Val <=	60 %	< Val <=	80 %	< Val <=	100 %	< Val

Seule la mise en évidence d'une séroconversion franche réalisée à partir de deux échantillons sériques couplés prélevés à 2-3 semaines d'intervalle peut fournir un diagnostic fiable. Le premier prélèvement devra être effectué durant la phase aiguë de l'affection. On considère qu'il y a séroconversion franche lorsqu'il y a un accroissement du signal de 2 croix (par exemple : ++ → ++++ ou + → +++).

Un échantillon doit être considéré comme positif s'il fournit un résultat supérieur ou égal à une croix (+).

VIII – POUR COMMANDER

Multiscreen AbELISA Respiratoire bovin:

2 X 16 échantillons

BIO K 369/2

