



MULTISCREEN^{Ag} ELISA

Digestif veau

Test ELISA pour le diagnostic antigénique du Rotavirus et Coronavirus

Test sandwich pour matières fécales

Test diagnostique pour veaux

I - INTRODUCTION

La diarrhée est une des causes majeures de mortalité chez les jeunes veaux de moins d'un mois. La gastroentérite néonatale est souvent plurifactorielle chez le bovin. Elle peut être la conséquence d'une infection par virus (Corona et Rotavirus), bactéries (*Salmonella*, Colibacille entérotoxigène) ou protozoaires (*Cryptosporidium*). 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 des signes cliniques. La technique ELISA est de mise en oeuvre facile, demande peu de moyens et se prête particulièrement bien à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Le test est rapide, fiable et peut être évalué directement à l'oeil si un équipement spectrophotométrique n'est pas disponible.

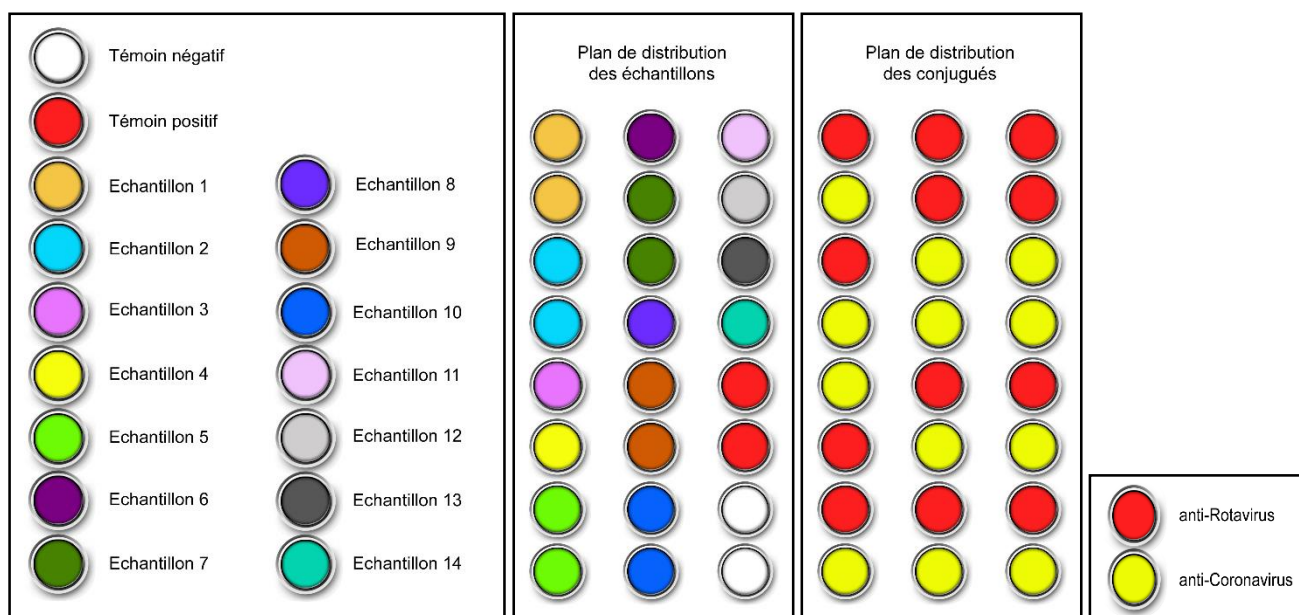
II - PRINCIPE DU TEST

L'entièreté de la microplaque du test est sensibilisée avec un mélange d'anticorps spécifiques des 2 agents pathogènes (voir le schéma de la dernière page). Les anticorps assurent la capture des agents pathogènes à partir de l'échantillon. Les matières fécales sont diluées dans le tampon de dilution et incubées durant une demi-heure sur la microplaque. On ajoute sur la microplaque un témoin positif et un témoin négatif.

Après incubation et lavage de la préparation, les conjugués prêts à l'emploi sont distribués sur la plaque. Le choix du ou des conjugués est laissé à l'utilisateur du test.

Le schéma de la page suivante présente un exemple de plan de distribution des échantillons et des conjugués.

A l'issue d'une seconde incubation d'une demi-heure à 21°C +/- 3°C et d'un second lavage, on ajoute le chromogène, la tétraméthylbenzidine (TMB). 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 d'un ou de plusieurs des agents pathogènes recherchés dans l'échantillon, le ou les conjugués correspondants restent fixés dans les cupules et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en agent pathogène de l'échantillon.



III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaque** : microplaque de 96 puits. L'entièreté de la plaque est sensibilisée avec les anticorps spécifiques des 2 agents pathogènes.
- **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.
- **Tampon de dilution** : flacon de tampon de dilution coloré, 5x concentré. Diluer 5x le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
Stocker la solution diluée entre +2°C et +8°C. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.
- **Conjugué** : flacons de 12 ml de conjugué coloré.
La spécificité des conjugués est indiquée sur les flacons. Les réactifs sont prêts à l'emploi.
- **Témoin positif** : flacon contenant 3 ml de témoin positif. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Témoin négatif** : flacon contenant 3 ml de témoin négatif. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Solution de TMB monocomposant** : 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** : flacon de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M. Le réactif est prêt à l'emploi.

	BIO K 314/1
Microplaques	1
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)
Conjugués	2 X 12 ml (1 X)
Contrôle positif	1 X 3 ml (1 X)
Contrôle négatif	1 X 3 ml (1 X)
Solution TMB monocomposant	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), 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- Diluer au demi les matières fécales dans le tampon de dilution. Si la consistance de l'échantillon rend l'homogénéisation difficile, ajouter des billes de verre dans le récipient et déliter la selle en agitant vigoureusement l'ensemble. Ne pas centrifuger.
- 3- Retirer la microplaque de son emballage.
- 4- Distribuer les échantillons dilués à raison de 100 µl par puits. Veiller à changer de pointes entre 2 échantillons différents. Le plan de distribution des échantillons sur la microplaque est établi par l'utilisateur en fonction du nombre de matières fécales à tester et des valences sélectionnées pour chaque échantillon. Distribuer également le témoin positif et le négatif (un puits par valence testée). Si le plan de distribution des échantillons et des conjugués est complexe, il faut remplir des formats.
- 5- Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant une demi 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 les conjugués à raison de 100 µl par puits.
- 8- Couvrir et incuber la plaque une demi heure à 21°C +/- 3°C.
- 9- Laver la plaque comme décrit au point 6.
- 10- 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.
- 11- Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C sans couvrir et à l'obscurité.
- 12- Interpréter les résultats visuellement en coloration bleue sauf si on souhaite enregistrer les signaux à l'aide d'un lecteur de plaques. Si tel est le cas, il faut passer au point 13 et bloquer la réaction à l'aide de la solution d'arrêt (lecture dans le jaune).
- 13- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.

14-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

Si on réalise une lecture au spectrophotomètre, calculer pour chaque échantillon la densité optique nette en déduisant de chaque résultat obtenu, la densité optique du contrôle négatif correspondant.

Procéder à la même opération pour les antigènes positifs de contrôle.

Le test ne peut être validé que si les antigènes positifs de contrôle fournissent une différence de densité optique en dix minutes supérieure aux valeurs suivantes :

Rotavirus	> 1,000
Coronavirus	> 1,000

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur fournie avec le contrôle positif correspondant et multiplier ce résultat par 100 pour l'exprimer sous la forme d'un pourcentage.

$$\text{Val(eur)} = \frac{\text{Delta DO éch} * 100}{\text{Delta DO pos}}$$

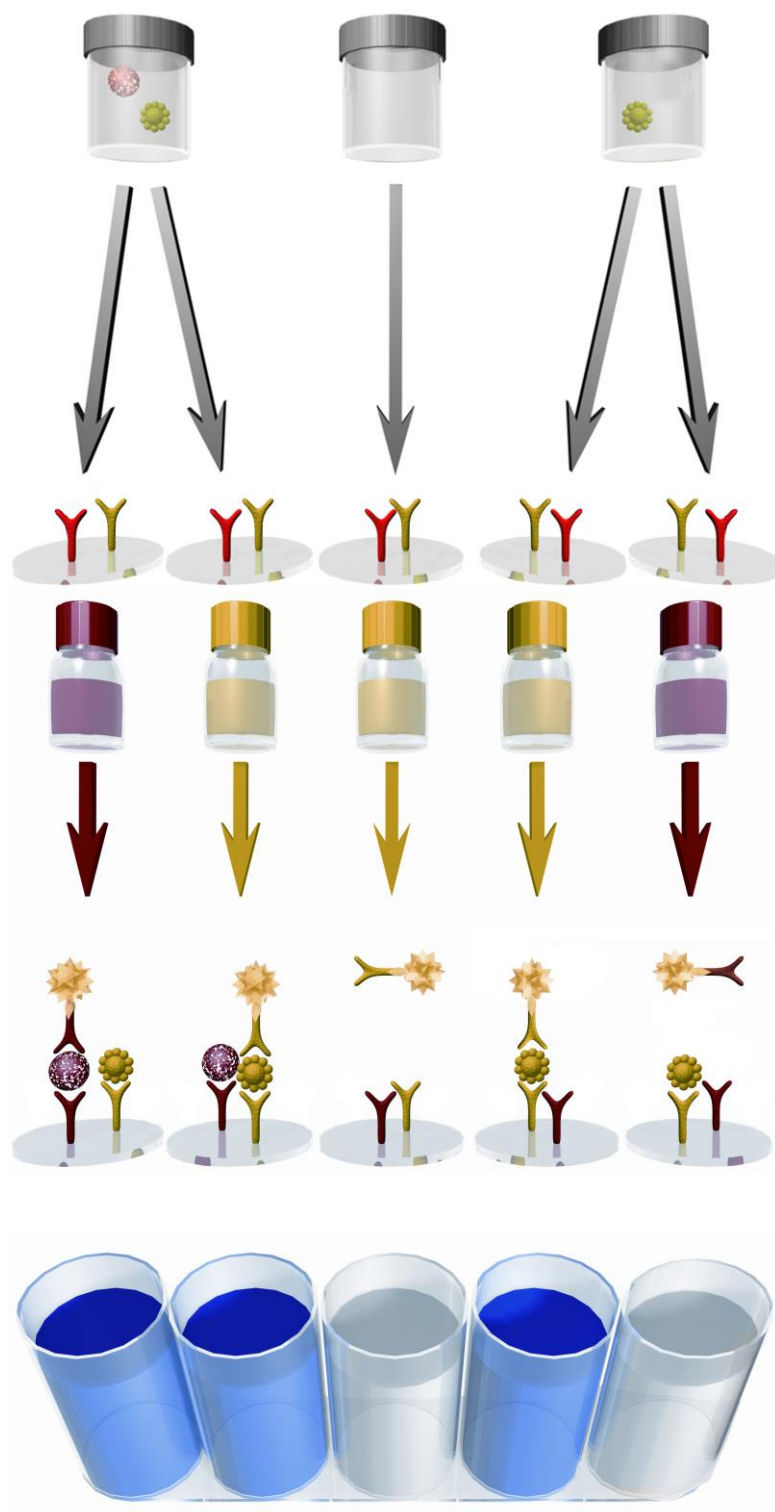
En utilisant le premier tableau repris ci-dessous, déterminer le statut des échantillons : (positif ou négatif).

Rotavirus	Val > = 6,00 %
Coronavirus	Val > = 7,00 %

Tout échantillon donnant un résultat supérieur ou égal aux pourcentages ci-dessus est considéré comme positif pour la valence considérée.

A l'opposé, tout échantillon donnant un résultat inférieur aux pourcentages ci-dessus est considéré comme négatif pour la valence considérée.

Si on réalise une interprétation visuelle des résultats (lecture dans le bleu), considérer comme positifs les échantillons qui produisent une coloration bleue supérieure à la coloration de la cupule témoin négatif correspondante.



VIII – POUR COMMANDER

Multiscreen AgELISA Digestif veau

1 X 96 échantillons BIO K 314/1