



# MULTISCREEN<sup>Ag</sup> ELISA

## Respiratoire bovin

Test ELISA pour le diagnostic antigénique  
du BoHV-1, BVDV, BRSV et BPI3  
Test sandwich pour lysats tissulaires  
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 parainfluenza 3 virus, et une bactérie comme *Mannheimia haemolytica*.

La trousse ELISA respiratoire 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 des anticorps spécifiques des agents pathogènes recherchés. Ces anticorps assurent la capture de ces agents à partir de l'échantillon dans lequel ils se trouvent. Les lignes B, D, F et H de ces microplaques ont été sensibilisées avec des anticorps non spécifiques des agents pathogènes. Ces témoins négatifs permettent de déterminer ce qui a été fixé de façon spécifique sur la microplaque. Leur utilisation permet de limiter dans des proportions importantes les résultats faussement positifs. Les échantillons sont dilués dans le tampon de lyse et incubés durant une heure sur la microplaque. Après cette incubation, la plaque est rincée et on applique les conjugués (des anticorps monoclonaux couplés 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. Lors de présence d'un ou de plusieurs des agents pathogènes recherchés dans l'échantillon, le ou les conjugués correspondants restent fixés sur leurs cupules respectives et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité



- 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 respiratoire antigénique pour tester la croissance de virus sur des cellules susceptibles (lignées primaires, VERO, HEP2, MDBK ). 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 dilués à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante : échantillon 1 dans les puits de la colonne 2, échantillon 2 dans les puits de la colonne 3, etc.. Distribuer le contrôle positif à raison de 100 µl dans tous les puits de la colonne 1.
- 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 les conjugués à raison de 100 µl par puits.
 

Conjugué anti-BoHV-1 (rouge) :	lignes A et B
Conjugué anti-BVDV (jaune) :	lignes C et D
Conjugué anti- BRSV (bleu) :	lignes E et F
Conjugué anti- Parainfluenza 3 (vert) :	lignes G et H

 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.
- 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 correspondants (B, D, F, H) et noter le résultat obtenu (calcul des deltas 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 des différences de densité optique en dix minutes supérieures aux valeurs indiquées sur le contrôle de qualité annexé à la notice.

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue 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 dans le contrôle de qualité, déterminer le statut des échantillons: (positif ou négatif).

### VIII – POUR COMMANDER

Multiscreen AgELISA Respiratoire bovin:

2 X 12 échantillons

BIO K 340/2

5 X 12 échantillons

BIO K 340/5

