



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 polyfactorielle 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. Il est possible d'identifier ces agents pathogènes par différentes méthodes de mise en culture, de flottaison et même de coloration. Mais toutes ces méthodes sont laborieuses et peu pratiques. Rapidement elles ont été remplacées par le test ELISA. 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

Les lignes suivantes (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 (matières fécales). 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 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 les conjugués dans les puits correspondants. Ces conjugués sont des anticorps monoclonaux couplés à la peroxydase. Ils sont spécifiques des agents pathogènes. 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 cancérogène. En cas de présence d'un ou des deux 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 de la coloration est proportionnelle à la teneur en agent pathogène de l'échantillon. Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée avec l'anticorps témoin est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'anticorps spécifique. Un contrôle positif est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques:** 2 microplaques de 96 puits. La répartition des anticorps de capture est représentée sur le schéma suivant.
Ligne A: anti-Rotavirus
Ligne B: contrôle
Ligne C: anti-Coronavirus
Ligne D: contrôle
Ligne E: anti-Rotavirus
Ligne F: contrôle
Ligne G: anti-Coronavirus
Ligne H: contrôle
- **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.
- **Conjugués :** 2 flacons de 12 ml de conjugués : A chaque valence correspond une couleur rotavirus (rouge), coronavirus (jaune).
La spécificité des conjugués est indiquée sur les flacons. Les réactifs sont prêts 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 347/2
Microplaques	2
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)
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 trousses.
- 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 dans les puits E1 - H1, échantillon 2 dans les puits A2 - D2, etc.. Distribuer le contrôle positif à raison de 100 µl dans les puits A1 à D1.
- 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 les conjugués à raison de 100 µl par puits.
 Conjugué anti-Rotavirus (rouge) : lignes A, B, E et F
 Conjugué anti-Coronavirus (jaune) : lignes C, D, G et H.
 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 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

Pour chaque échantillon, calculer la densité optique nette en déduisant de chaque résultat obtenu, la densité optique du puits négatif correspondant.

Procéder à la même opération pour le contrôle positif.

Le test ne peut être validé que si le contrôle positif 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 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 Digestif veau

2 X 24 échantillons

BIO K 347/2

