



MONOSCREEN^{Ab} ELISA

Coronavirus bovin

Test ELISA pour le diagnostic sérologique du Coronavirus bovin
Test de compétition pour sérums sanguins, plasmas, colostrums et laits
Test diagnostique pour bovins
Monocupule

I - INTRODUCTION

La diarrhée est une des causes majeures de mortalité chez les jeunes veaux de moins d'un mois. Depuis la découverte en 1969 par Mebus que des virus pouvaient être détectés dans des selles de veaux souffrant de diarrhée, il a été prouvé que le coronavirus pouvait infecter le veau et être responsable de diarrhées parfois sévères. Le coronavirus est un des agents associés aux problèmes de gastroentérite chez le jeune veau. Le coronavirus est ubiquiste et de ce fait, la majorité des animaux provenant d'exploitations pratiquant une politique d'élevage intensif possède des anticorps spécifiques de ce pathogène. Les anticorps produits par la vache suite à des immunisations naturelles ou par la vaccination sont transmis à la naissance au veau via le colostrum. Il arrive fréquemment que la transmission des immunoglobulines colostrales au veau ne s'effectue pas correctement (colostrum de mauvaise qualité, administration trop tardive, quantité trop faible, mammite avant vêlage etc...) et de ce fait, la protection du veau est insuffisante. La trousse sérologique Coronavirus permet de mesurer le taux de protection spécifique du jeune veau vis-à-vis du coronavirus. Pour cela, il convient de prélever un échantillon sérique dans les premiers jours qui suivent la naissance lorsque le veau est toujours sous protection colostrale et avant qu'il n'ait pu développer une immunité active contre le virus. D'autre part il faudra attendre au moins 24 heures après la première prise de colostrum avant de réaliser la prise de sang de contrôle pour que la résorption intestinale des immunoglobulines ait pu se dérouler. La trousse peut également être utilisée pour tester l'efficacité de préparations vaccinales.

II - PRINCIPE DU TEST

Les microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par du Coronavirus bovin purifié. L'utilisateur de la trousse dépose dans les cupules de la microplaque les sérums sanguins, plasmas, colostrum ou laits à tester préalablement dilués puis il ajoute le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique du coronavirus bovin couplé à la peroxydase. Après incubation et lavage de la préparation, 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 cancérigène. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle au titre sérique de l'échantillon. Des sérums de contrôle positif et négatif sont fournis avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **Microplaques** : microplaques de 96 puits. L'entièreté des microplaques est sensibilisée avec du coronavirus bovin .
- **Solution de lavage** : flacon 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** : flacon de tampon de dilution coloré, concentré 5 fois. Diluer 5 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée. Cette solution est utilisée pour la dilution des sérums sanguins, des plasmas des colostrums et du conjugué. En cas d'utilisation partielle, bien mélanger et en prélever le volume nécessaire. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.
- **Conjugué** : flacon de conjugué anti-coronavirus bovin: (anticorps monoclonal anti-coronavirus bovin couplé à la peroxydase de raifort). Le réactif doit être dilué au 1/20 dans le tampon de dilution.
- **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** : 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.

	BIO K 392/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)
Conjugué	1 X 1,250 ml (20 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, 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
Diluer les échantillons en suivant les dilutions conseillées et reprises dans le tableau ci-dessous :

Matrice	Dilution totale	Plan de dilution des échantillons conseillé			
		Dilution individuelle	Nombre de dilution	Volume d'échantillon à transférer	Volume de tampon de dilution
Sérum, plasma, sérum de référence	1/100	1/100	1	10 µl	990 µl
Colostrum	1/1000	1/31,6	2	25 µl	765 µl
Lait*	1/1	1/1	1	/	/

*Les laits sont utilisés sans dilution et entier (sans écrémage).

- 3- Distribuer les échantillons dilués à raison de 100 µl par puits sur la microplaque de la trousse. Procéder de la même manière pour les sérums de référence (sérums positif et négatif).
- 4- Ajouter dans chaque puits utilisé, 100 µl du conjugué dilué au 1/20 dans le tampon de dilution (par exemple pour une plaque, diluer 600 µl de la solution mère de conjugué dans 11,4 ml de tampon de dilution). En ajoutant le conjugué, bien veiller à ne pas contaminer la micropointe en l'immergeant dans les sérums. Incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant 1 heure. Utiliser un couvercle.
- 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 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.
- 7- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 8- 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 – CALCUL DES RESULTATS

Mesurer les densités optiques des sérums positif et négatif (DO pos et DO nég) ainsi que celles de tous les échantillons (DO échantillons).

Pour chaque échantillon testé et pour le sérum positif, calculer le pourcentage d'inhibition (%inh) en appliquant les formules suivantes :

$$\% \text{ inh échantillon} = [(DO \text{ nég} - DO \text{ échantillon}) / DO \text{ nég}] * 100$$

$$\% \text{ inh positif} = [(DO \text{ nég} - DO \text{ pos}) / DO \text{ nég}] * 100$$

VIII – VALIDATION DU TEST

Le test ne peut être validé que si les deux conditions suivantes sont remplies :

- DO nég – DO pos > 0,5
- % inh positif > 40 %

IX – INTERPRETATION DES RESULTATS

Déterminer le niveau de positivité des échantillons en utilisant l'échelle reprise au tableau 1.

Tableau 1	Valeur calculée	Niveau de positivité
	$\% inh < 20$	0
	$20 \leq \% inh < 40$	+
	$40 \leq \% inh < 60$	++
	$60 \leq \% inh < 80$	+++
	$80 \leq \% inh$	++++

X – POUR COMMANDER

Monoscreen AbELISA Coronavirus bovin:

2 X 96 tests BIO K 392/2

