

SVANOVIR® BRSV-Ab

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin

Test d'anticorps

Contenu	Art. No. 10-2500-02
Microplaque / Microtitre plate Microplaque (96 puits) sensibilisée avec l'antigène non infectieux de BRSV (scellée et gardée au sec). Colonnes impaires sensibilisées avec l'antigène viral et les colonnes paires avec l'antigène de contrôle.	2 (Barrettes) 6 x 16
Conjugué / Conjugate Prêt à l'emploi (anticorps monoclonal anti-IgG de bovin conjugué à la peroxydase)	1 x 24 mL
Solution de PBS-Tween / PBS-Tween Solution Concentrée 20 x	1 x 125 mL
Tampon de dilution des échantillons / Sample Dilution Buffer Prêt à l'emploi	1 x 25 mL
Solution de substrat / Substrate Solution (TMB contenant de l'H ₂ O ₂) - CONSERVER A L'OBSCURITE	1 x 20 mL
Solution d'arrêt / Stop Solution Contient de l'acide sulfurique (2M) -CORROSIF	1 x 10 mL
A. Sérum contrôle positif / Positive Control Serum - Contient des conservateurs	1 x 0.1 mL
B. Sérum contrôle négatif / Negative Control Serum - Contient des conservateurs	1 x 0.1 mL

Cette notice concerne le kit
SVANOVIR® BSRV-Ab ELISA kit: Article
number 10-2500-02

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin

Test d'anticorps

Nom et application

SVANOVIR® BRSV-Ab est un kit immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre BRSV dans le sérum et le lait de bovin.

Informations générales

Le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) est un pneumovirus homologue au RSV humain, affectant les voies respiratoires principalement chez les nourrissons. Un RSV caprin est également connu. Le nom du virus provient de grandes masses syncytiales qui se forment dans des cultures de cellules infectées. Le RSV bovin est associée à des maladies des voies respiratoires supérieures et inférieures touchant principalement les veaux de moins de 12 mois et les vaches en lactation. Les premiers symptômes de la maladie sont la fièvre, la toux, et un écoulement oculaire et nasal. L'apparition d'anorexie, tachypnée et dyspnée indique un stade plus avancé et plus grave de la maladie qui peut conduire à une pneumonie mortelle. Le RSV est transmis horizontalement par contact direct avec les sécrétions respiratoires (aérosols). L'infection est facilitée par l'encombrement pendant le processus de traite et quand les animaux sont logés pendant les mois d'hiver. Les veaux nouvellement acquis doivent être isolés et l'absence d'infection doit être contrôlée afin de prévenir la contamination des troupeaux indemnes. La réponse en anticorps à l'infection par le RSV est bien documentée et permet un diagnostic rapide.

Principe

La méthode du kit repose sur un test immuno-enzymatique indirect en phase solide (ELISA). Dans cette méthode, les échantillons sont exposés à l'antigène BRSV non infectieux dans les puits sensibilisés de la microplaque/barrette. Les anticorps BRSV (si présents dans l'échantillon) se lient à l'antigène présent dans le puits. Le conjugué HRP qui est ensuite ajouté forme un complexe avec ces anticorps anti-BRSV. L'excès non lié est éliminé par rinçages avant l'ajout de la solution substrat. Une couleur bleue se développe, qui est due à la conversion du substrat par le conjugué. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une couleur bleue. La réaction est arrêtée par l'ajout de la solution stop, la couleur vire au jaune. Le résultat est lu par un spectrophotomètre pour microplaque, où la densité optique (DO) est mesurée à 450 nm.

Matériels nécessaires mais non fournis

1. Micropipettes de précision
2. Embouts jetables pour micropipette
3. Eau distillée, déionisée ou de l'eau ultrapure
4. Pipetteur à canaux multiples ou laveur de microplaques
5. Récipient de 1 à 2 litres pour le PBS Tween
6. Spectrophotomètre à microplaques (filtre de 450nm)

Information sur les échantillons

Sérum:

4µl de sérum ou de plasma sont nécessaires pour chaque puits. Des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables.

Lait :

100µl de lait écrémé sont nécessaires pour chaque puits d'échantillon. Des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables. Les échantillons de lait doivent être centrifugés pendant 15 minutes à 2000 x g pour enlever la couche de lipide. Sinon, laisser les échantillons de lait jusqu'à ce que la couche de graisse se forme sur le dessus de l'échantillon. Pipeter sous la couche de graisse.

Préparation des réactifs :

Tampon PBS-Tween: Diluer au 1/20 la solution concentrée de PBS-Tween dans de l'eau purifiée. Préparer 500 ml par plaque en diluant 25 ml dans 475 ml d'eau et bien mélanger.

N.B. Avant la dilution, s'assurer qu'il ne reste pas de cristaux dans le tampon. Pour dissoudre les restes de cristaux, réchauffer et bien mélanger.

Précautions

1. Lire attentivement les instructions et s'y conformer strictement.
2. Conserver le kit et tous les réactifs entre 2 - 8°C.
3. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante entre 18-25°C avant usage.
4. Manipuler tout le matériel conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
5. Ne pas mélanger les composants ni les manuels de différents lots de kits.
6. Prendre soin d'éviter toute contamination des composants du kit.
7. Respecter la date de péremption du kit.
8. Ne pas manger, boire, ni fumer là où sont manipulés les échantillons et les réactifs.
9. Changer d'embout de micropipette pour chaque échantillon.
10. Ne jamais pipeter à la bouche.
11. Inclure des contrôles de sérum négatif et positif sur chaque plaque ou série de barrettes.
12. N'utiliser que de l'eau distillée, déionisée ou ultrapure pour la préparation des réactifs.
13. Lors de la préparation des tampons, mesurer le volume requis.
14. La solution stop contient de l'acide sulfurique qui est corrosif.
15. L'élimination des matériaux biologiques doit être réalisée dans le respect des réglementations locales, régionales et nationales.

Recommandations !

Le volume des réactifs est suffisant pour au moins 8 tests séparés.

Les barrettes dont l'emballage est ouvert peuvent être conservées entre 2-8°C pendant 4 semaines au maximum.

Procédure

1. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante 18-25°C avant usage. Annoter chaque barrette avec un numéro.
2. Ajouter les échantillons

Les sérums de contrôle positif et négatif fournis sont utilisés à la fois pour l'analyse de sérum et de lait.

Echantillons de sérums

- A. Ajouter 100µl de tampon de dilution des échantillons dans chaque puits qui sera utilisé pour les échantillons de sérum et les contrôles.
- B. Ajouter 4µl de contrôle positif (Réactif A) et 4µl de contrôle négatif (Réactif B) respectivement dans les puits sensibilisés avec l'antigène BRSV et dans les puits sensibilisés avec l'antigène contrôle. Pour une confirmation, il est recommandé de tester les contrôles en doublons.
- C. Ajouter 4µl d'échantillon de sérum dans les puits sensibilisés avec l'antigène BRSV et dans les puits sensibilisés avec l'antigène contrôle. Les échantillons peuvent être testés en simple ou en doublons. Toutefois, pour un test de confirmation, il est recommandé de tester les échantillons en doublons.

Continuer à l'étape 3.

Echantillons de lait

- A. Pour l'addition de contrôle, voir "Echantillons de sérums" (point A et B).
- B. Ajouter 100µl d'échantillon de lait écrémé dans les puits sensibilisés avec l'antigène BRSV et dans les puits sensibilisés avec l'antigène contrôle. Les échantillons peuvent être testés en simple ou en doublons. Toutefois, pour un test de confirmation, il est recommandé de tester les échantillons en doublons.

Continuer à l'étape 3.

3. Mélanger la plaque. Couvrir la plaque/barrettes et incubé à 37°C pendant 1 heure.
4. Laver la plaque/les barrettes 3 fois avec 300µL de tampon PBS-Tween dilué : à chaque cycle de lavage, remplir les puits, vider la plaque, et tapoter sur du papier absorbant pour éliminer les restes de liquide.
5. Ajouter 100µl de conjugué HRP dans chaque puits. Couvrir la plaque/barrette et incubé à 37°C pendant 1 heure.

6. Répéter l'étape 4.
7. Ajouter 100µL de solution de substrat dans chaque puits. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante 18-25°C. Commencer le décompte quand le premier puits est rempli.
8. Arrêter la réaction en ajoutant 50µl de la solution stop dans chaque puits et mélanger. Ajouter la solution stop dans le même ordre que la solution de substrat (étape 7)
9. Mesurer la densité optique (DO) des contrôles et des échantillons à 450 nm dans un spectrophotomètre pour microplaques. Mesurer la DO dans les 15 minutes suivant l'ajout de la solution stop afin d'éviter les fluctuations des valeurs de DO.

Calculs

Calculer les résultats en deux étapes comme décrit ci-dessous.

1. Valeurs de DO corrigées (DO_{corr})

Les valeurs de densité optique dans les puits sensibilisés avec l'antigène de BRSV sont corrigées en soustrayant les valeurs de DO des puits contenant l'antigène de contrôle.

$$DO_{BRSV} - DO_{Contrôle} = DO_{corr}$$

Calculer les valeurs moyennes de DO_{corr} pour chaque échantillon échantillon et contrôles.

2. Valeurs de pourcentage de positivité (PP)

Toutes les valeurs corrigées de DO pour les tests d'échantillons comme pour le contrôle négatif sont reliées à la valeur de DO corrigée du contrôle positif selon la formule suivante :

$$PP = \frac{DO_{corr} \text{ (Echantillon ou Contrôle négatif)}}{DO_{corr} \text{ (Contrôle positif)}} \times 100$$

Interprétation des résultats

Critère de validité du test

Pour garantir la validité de l'essai, les valeurs de DO des duplicats du contrôle positif ne doivent pas différer de plus de 25% de la valeur moyenne de ces duplicats. En outre, les valeurs des contrôles doivent être comprises dans les limites suivantes :

DO_{corr} Contrôle positif > 0.5

PP Contrôle négatif < 10

Si l'un de ces critères n'est pas satisfaisant, le test est invalide. Pour les tests invalides, la technique peut-être suspectée et l'essai doit être répété.

Interprétations des échantillons de sérums et de laits :

PP	Interprétation
< 10	Négatif
≥ 10	Positif

References

1. Trudel, M. *et al.* (1989). Comparison of caprine, human and bovine respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.* 107, 141-149.
2. Verhoeff, J., Van der Ban, M., and van Nieuwstadt, A.P.K.M.I. (1984). Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and haematological findings. *Vet. Rec.* 114, 9-12.
3. Kahrs, R.F. (1981). Respiratory syncytial virus. In *Viral Diseases of Cattle*. Edited by Robert F. Kahrs. The Iowa State University Press. Ames, Iowa, pp. 215-220.
4. Westenbrink, F. *et al.* (1989). Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves. *J. Gen. Virol.* 70, 591-601.
5. Ohlson A. *et al.* (2010). Risk factors for seropositivity to bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus in dairy herds. *Vet. Rec.* Aug 7; 167(6): 201-6.
6. Beaudeau F. *et al.* (2010). Spatial patterns of bovine respiratory syncytial virus in the Swedish beef cattle population. *Acta Vet Scand.* May 21;52:33.

Symbols

	Article No.
	Serial (batch) No.
	Temperature limit
	Expiry date
	Corrosive
	Number of tests
	See manual
	Manufacturer
	Telephone
	Fax



Produit par SVANOVA
Distribué par BIOSELLAL SAS
Bâtiment Accinov
317 Avenue Jean Jaurès
69007 LYON
FRANCE



+33 (0) 4 26 78 47 60

Support technique



+33 (0) 4 26 78 47 60
contact@biosellal.com

