

SVANOVIR® BVDV p80-Ab

Bovine Virus Diarrhoea Virus p80 Antibody Test

Bovine Virus Diarrhoea Virus p80
Antikörper Test

Virus de la diarrée virale bovine p80
prueba para anticuerpos

Test d'anticorps anti p80 du Virus
de la Diarrhée Bovine Virale

Contenu	N° d'article 10-2210-02
Microplaques Microplaques (96 puits) sensibilisées avec l'antigène non infectieux de VDV p80 (scellées et gardées au sec)	2 (Barettes) 8 x 12
Conjugué Prêt à l'emploi (peroxydase de raifort conjugué à des anticorps monoclonaux anti-p80)	1 x 24 mL
Solution de PBSTween Concentrée 20 fois	1 x 125 mL
Solution de substrat (Tétraméthylbenzidine dans le tampon de substrat contenant H ₂ O ₂) - CONSERVER À L'OBSCURITÉ!	1 x 20 mL
Solution d'arrêt Contient de l'acide sulfurique (2M) - CORROSIF!	1 x 10 mL
A. Sérum de contrôle positif - Contient des agents conservateurs	1 x 0,2 mL
B. Sérum de contrôle négatif - Contient des agents conservateurs	1 x 0,2 mL

Ce manuel concerne la trousse
SVANOVIR® BVDV p80-Ab:
N° d'articles 10-2210-02

Test d'anticorps anti p80 du Virus de la Diarrhée Bovine Virale

Nom et application

Le SVANOVIR® BVDV p80-Ab est un trousses immunoenzymatique (ELISA) pour la détection d'anticorps spécifiques de la protéine p80 du virus de la diarrhée virale bovine dans le sérum, le plasma et le lait individuel de bovins, caprine et ovin, et le lait de citerne.

Informations générales

Le virus de la diarrhée virale bovine (VDVB), un pestivirus, est associé à une série de maladies affectant l'appareil digestif des bovins. Les signes cliniques incluent la pyrexie, la diarrhée et la baisse du rendement laitier. La morbidité est élevée mais la mortalité est faible chez les animaux infectés¹. L'infection de vaches gestantes peut conduire à une infection transplacentaire du fœtus. Les fœtus peuvent être avortés, momifiés, mort-nés ou peuvent naître avec de graves anomalies. Toutefois, dans de nombreux cas, des veaux, immunotolérants, sont nés sans symptômes apparents mais avec une virémie persistante et sont devenus des sources de transmission du virus². De plus, l'infection récurrente de ces veaux peut provoquer une maladie des muqueuses³; un état induisant une faible morbidité mais une mortalité élevée. Il se caractérise par des érosions étendues des muqueuses orales et gastro-intestinales. Il a également été démontré que le VDVB a des effets immunosuppresseurs qui prédisposent les animaux aux infections par d'autres microorganismes⁴. Les pertes économiques peuvent être importantes en raison de ces facteurs, c'est pourquoi la présence de ces infections devrait être surveillée régulièrement dans les troupeaux.

Principe

La méthode repose sur une ELISA de blocage en phase solide. Dans cette méthode, les échantillons sont exposés dans des puits de plaques ou de barrettes de microtitration recouverts d'antigène de VDVB non infectieux. Si des anticorps spécifiques de VDVB sont présents dans l'échantillon, ils se lient aux antigènes viraux dans le puits et bloquent ces sites antigéniques. Si l'échantillon ne contient pas d'anticorps anti-VDVB, ces sites restent libres. L'anticorps monoclonal anti-p80 de VDVB conjugué à la peroxydase ajouté ensuite se lie aux sites dénués d'antigène BVDV dans le puits. Le matériel non lié est éliminé par rinçage avant l'ajout d'une solution de substrat. Apparaît ensuite une couleur bleue due à la conversion du substrat par le conjugué. Un résultat négatif est indiqué par l'apparition d'une couleur bleue. La réaction est arrêtée par l'addition de la solution d'arrêt ; ce qui rend la couleur jaune. Le résultat peut être lu par un photomètre à microplaques, avec lequel 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, desionisée ou de l'eau ultrapure
4. Pissette, pipette à canaux multiples ou laveur de microplaques.
5. Récipient de 1 à 2 litres pour le PBS Tween
6. Photomètre à microplaques (filtre de 450 nm)

Information sur les échantillons **Sérum individuel ou mélanges jusqu'à 10 échantillons sériés:**

Un volume de 10 µL de sérum sanguin ou de plasma est requis pour chaque puits. Des sérums ou des plasma frais, réfrigérés ou congelés peuvent être utilisés.

Lait individuel ou échantillons de mélanges/ lait de citerne jusqu'à 50 animaux:

Un volume de 100 µL de lait écrémé est requis pour chaque puits. Le lait frais, réfrigérés ou congelés peuvent être utilisés. Il est recommandé de centrifuger préalablement les échantillons de lait pendant 15 minutes à 2000 x g pour éliminer la couche lipidique, ou de laisser reposer les échantillons de lait jusqu'à ce qu'une couche de graisse se forme à la surface. Ensuite pipeter sous la couche de graisse formée.

Préparation des réactifs

Tampon PBS-Tween:

Diluer 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 la trousse 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 des composantes ni confondre des monographies de différentes séries de trousse.
6. Prendre soin d'éviter toute contamination des composantes de la trousse.
7. Respecter la date de péremption de la trousse.
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 négatifs et positifs sur chaque plaque ou série de barrettes.
12. N'utiliser que de l'eau distillée, désionisée ou ultrapure pour la préparation des réactifs.
13. Quand les solutions de tampons sont préparées etc... mesurer le volume nécessaire.
14. La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique, qui est corrosif.
15. L'élimination des matériaux biologiques non utilisés doit être réalisée dans le respect des réglementations locales, régionales et nationales.

Recommandations!

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

Il y a toujours un surplus de volume pour le réactif liquide. Le volume indiqué sur l'étiquette est le minimum que l'on puisse obtenir.

Protocole

1. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante, entre 18-25°C, avant utilisation. Étiqueter chaque barrette en lui affectant un numéro.
2. Préparer les échantillons
Les sérums contrôles positifs et négatifs fournis seront utilisés pour la détection d'anticorps aussi bien au niveau du sérum qu'au niveau du lait.

Échantillons de sérum

- A. Déposer 90 µL de tampon de PBS-Tween dans chaque puits qui servira pour les échantillons de sérum et les contrôles de sérum.
- B. Déposer 10 µL de sérum de contrôle positif (réactif A) et 10 µL de sérum de contrôle négatif (réactif B) dans des puits sélectionnés. Pour une confirmation, il est recommandé d'utiliser les sérums de contrôle en duplicata.
- C. Déposer 10 µL d'échantillon de sérum dans un puits sélectionné. Les échantillons peuvent être testés individuellement ou en duplicata. Pour confirmation du résultat, il est toutefois recommandé de traiter les échantillons en duplicata.

Poursuivre à l'étape 3.

Échantillons de lait

- A. Pour l'ajout des contrôles, se référer à "Échantillons de sérum" (point A et B)
 - B. Déposer 100 µL d'échantillon de lait écrémé dans un puits sélectionné. Les échantillons peuvent être testés individuellement ou en duplicata. Pour confirmation du résultat, il est toutefois recommandé de traiter les échantillons en duplicata.
Poursuivre à l'étape 3.
3. Agiter la plaque avec précaution. Couvrir la plaque/barrette avec un scellant adhésif et incubé à 37°C pendant 1 heure.
 4. Rincer les plaques/barrettes 3 fois avec le tampon PBS-Tween: À chaque cycle de rinçage, remplir les puits et vidanger la plaque en tapant vigoureusement pour éliminer tout reste de fluide.
 5. Déposer 100 µL de conjugué HRP dans chaque puits. Couvrir la plaque/barrette avec un scellant adhésif et incubé à 37°C pendant 1 heure.

6. Répéter l'étape de lavage du point 4.
7. Déposer 100 µL de la solution de substrat dans chaque puits et incubé pendant 10 minutes à la température ambiante entre 18-25°C. Commencer le chronométrage dès que le premier puits est rempli.
8. Arrêter la réaction en ajoutant 50 µL de la solution d'arrêt dans chaque puits et mélanger soigneusement. Déposer la solution d'arrêt dans le même ordre des puits que la solution de substrat au point 7.
9. Mesurer la densité optique (DO) des contrôles et des échantillons à 450 nm dans un spectrophotomètre à microplaques (utiliser l'air comme blanc).
Mesurer la DO dans les 15 minutes suivant l'addition de solution d'arrêt pour éviter la fluctuation des valeurs de DO.

Calculs

Le calcul des résultats est effectué telles que décrites ci-dessous.

1. Calculer la valeur de densité optique moyenne (DO) pour chaque contrôle et chaque échantillon.
2. Calculer les valeurs de pourcentage d'inhibition (PI) pour les contrôles positifs ainsi que les échantillons, en utilisant la formule suivante:

$$PI = \frac{DO_{\text{contrôle négatif}} - DO_{\text{échantillon ou contrôle positif}}}{DO_{\text{contrôle négatif}}} \times 100$$

Interprétation des résultats

Critères de validité du test

Pour garantir la validité des tests, le double des valeurs de la DO de chaque puits d'un contrôle négatif ne doit pas s'écarter de plus de 25% de la valeur moyenne du duplicata.

De plus, les valeurs de contrôle doivent être comprises dans les limites suivantes:

DO Contrôle négatif > 0,5

PI Contrôle positif ≥ 60

Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, le test n'est pas validé. Pour les tests non validés, la technique peut être suspectée, et l'essai doit être répété.

**Interprétation du résultat de
l'échantillon test**

Échantillon	PI	Interprétation
Sérum	< 45	Négatif
	≥ 45	Positif
Lait	< 30	Négatif
	≥ 30	Positif

Pour confirmer les résultats de chaque échantillon test, chaque valeur PI du duplicata doit être interprétée distinctivement, c'est-à-dire positive et négative. En cas de divergence, il est recommandé d'analyser à nouveau l'échantillon.

Bibliographie

1. Barber, D.M.L., Nettleton, P.F., and Herring, J.A. (1985) Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. Vet. Rec. 2, 459-464.
2. Van Oirschot, J.T. (1983) Congenital infections with nonarbo togaviruses. Vet Microbiol. 8, 321-361.
3. Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C. (1987). Comparision by the neutralization assays of pairs of noncytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. Vet. Microbiol. 13, 361-369.
4. Reggiardo, C., and Kaeberle, M.L. (1981) Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhoea virus. The Am. J. of Vet. Res. 42, 218-221.



Kit fabriqué par SVANOVA
Kit 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

Symbols/Symbole/Símbolos/Symboles

	Article No. / Artikelnummer / Nº de artículo / Nº d'article
	Serial (batch) No. / Ch.-B / Nº de lote / Nº de série (lot)
	Temperature limit / Lagerungstemperatur / Límite de temperatura / Limite de température
	Expiry date / Verwendbar bis / Fecha de caducidad / Date de péremption
	Corrosive / Ätzend / Corrosivo / Corrosif
	Number of samples / Probenanzahl / Nº de muestras / Nombre des échantillons
	See manual / Siehe Gebrauchsinformation / Ver el manual / Voir le manuel
	Manufacturer / Hersteller / Fabricante / Fabricant
	Telephone / Telefon / Teléfono / Téléphone
	Fax