

SVANOVIR® BCoV-Ab

Coronavirus bovin
Test d'anticorps

Contenu	Art. No. 10-2400-02
Microplaque / Microtitre plate Microplaque (96 puits) sensibilisée avec l'antigène non infectieux de BCV (scellée et gardée au sec). Colonnes impaires sensibilisées avec l'antigène viral et les colonnes paires avec l'antigène de contrôle.	2 (Barrettes) 12 x 8
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® BCV-Ab ELISA kit: Article
numéro 10-2400-02

Coronavirus bovin

Test d'anticorps

Nom et Application

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

Informations générales

Le Coronavirus bovin (BCV), est un membre de la famille des *Coronaviridae*. Il est l'une des causes majeures de diarrhée du veau nouveau-né dans les fermes laitières, les ranches d'élevage de veaux/vaches et les élevages allaitants. Le virus est également associé à une maladie des voies respiratoires. En outre, le BCV a également été identifié comme l'agent de la « dysenterie d'hiver » - une maladie des bovins adultes, accompagnée de diarrhées et d'une production de lait réduite. Dans les maladies entériques et respiratoires, le BCV est soit un agent unique ou un participant d'une infection mixte. La transmission se produit lorsque des matières fécales contenant le virus sont ingérées, conduisant à l'infection de l'épithélium de l'intestin par absorption. Après une brève période d'incubation de 19 à 24h, les veaux peuvent développer des symptômes, y compris une salivation excessive, faiblesse, léthargie, déshydratation et une diarrhée aigüe. La diarrhée sévère peut conduire à un choc hypovolémique et la mort. La congestion pulmonaire, pneumonie et la prédisposition à des infections bactériennes sont des facteurs secondaires de l'infection par BCV. Les veaux nouveau-nés peuvent obtenir une protection partielle contre le virus par le colostrum. La résistance dépend du titre en anticorps de la mère et la protection ne dure que quelques jours. Cliniquement, les infections à BCV ne sont pas faciles à distinguer des autres causes de diarrhée du veau nouveau-né, mais le diagnostic est possible grâce à l'analyse en laboratoire de matières fécales, de sérum ou de lait ¹.

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 BCV non infectieux dans les puits sensibilisés de la microplaque/barrette. Les anticorps anti-BCV (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-BCV. L'excès non lié est éliminé par rinçages avant l'ajout de la solution de 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 d'arrêt, 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. Pipette 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. Des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables. Les échantillons de lait entier doivent être centrifugés pendant 15 minutes à 2000 x g pour enlever la couche de lipide. Sinon, laisser reposer 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 composantes 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 sérums négatifs et positifs 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 d'arrêt 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.

Protocole

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

Contrôles

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

- A. Ajouter 100µl de tampon de dilution des échantillons dans chaque puits qui sera utilisé pour les contrôles.
- B. Ajouter 4µl de sérum contrôle positif (Réactif A) et 4µl de sérum contrôle négatif (Réactif B) respectivement dans les puits sensibilisés avec l'antigène BCV et dans les puits sensibilisés avec l'antigène contrôle. Pour une confirmation, il est recommandé de tester les sérums contrôles en doublons.

Echantillons de sérum

- A. Ajouter 100µl de tampon de dilution des échantillons dans chaque puits qui sera utilisé pour les échantillons de sérum.
- B. Ajouter 4µl d'échantillon de sérum dans les puits sensibilisés avec l'antigène BCV 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.

Echantillons de lait

- A. Pour l'addition de contrôle, voir "Echantillons de sérum" (point A et B).
- B. Ajouter 100µl d'échantillon de lait écrémé dans les puits sensibilisés avec l'antigène BCV 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.

3. Mélanger la plaque. Couvrir la plaque/barrettes et incuber 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 incuber 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 d'arrêt dans chaque puits et mélanger. Ajouter la solution d'arrêt 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 d'arrêt 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 BCV sont corrigées en soustrayant les valeurs de DO des puits contenant l'antigène de contrôle.

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

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

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 lait et de sérum:

PP	Interprétation
< 10	Négatif
≥ 10	Positif

References

1. Kahrs, R.F. (1981) Coronavirus. In Viral Diseases of Cattle. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 107-113.
2. McNulty, M.S. *et al.* (1984). Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. Vet. Microb. 9, 425-434.
3. Espinasse, J. *et al.* (1982). Winter dysentery: a coronavirus-like agent in the faeces of beef and dairy cattle with diarrhoea. Vet. Rec. 110, 385.
4. Alenius, S., Niskanen, R., Juntti, N., and Larsson, B. (1989/90) Bovine coronavirus as the causative agent of winter dysentery: serological evidence. Acta Vet. Scand. (In press).
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.

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