

MANUEL D'UTILISATION

SVANOVIR[®] *F.hepatica*-Ab

Kit ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre *Fasciola hepatica*

Méthode	Matrices	Espèces	Protocoles
ELISA indirect	Sérum individuel	Bovin	Incubation courte Incubation longue
	Mélange de 10 sérums		Incubation courte
	Jus de viande		
	Lait individuel		
	Lait de tank		

biosellal

Cat.No. : 104869

MU/FH/00003/FR

Rev 04/18

Réservé à l'usage vétérinaire

27 chemin des Peupliers
69570 Dardilly
FRANCE
+33 (0) 4 26 78 47 60
www.biosellal.com
contact@biosellal.com



• INFORMATIONS GÉNÉRALES

La fasciolose est une maladie parasitaire des herbivores causée par la douve du foie *Fasciola hepatica*. *F.hepatica* a un cycle de vie comprenant deux hôtes et les vers adultes restent dans le foie des herbivores. En fonction du degré de l'infection et de la réaction de l'hôte, des dommages, légers à graves, des tissus du foie peuvent apparaître. La fasciolose bovine apparaît souvent sous une forme subclinique, sans signes cliniques particuliers, qui est accompagnée d'une chute progressive de la production. Les pertes économiques pour l'élevage bovin se caractérisent par la chute du rendement du lait, de la fertilité et de la production de viande notamment la perte des foies infestés {1,2}. Des frais supplémentaires sont engendrés par les traitements vermifuges et les périodes de retrait du lait après traitement. En outre la fasciolose peut prédisposer les bovins aux infestations par des bactéries anaérobies (par exemple : *Fusobacterium necrophorum*, *Arcanobacterium pyogenes* ou *Clostridia spp.*) {3} ou à l'échec de la détection de la tuberculose bovine {4}. De plus, une infestation sévère par *Fasciola spp* est un problème pour le bien-être de l'animal. La prévalence de *F.hepatica* semble être en augmentation depuis la dernière décennie. Des différences régionales existent et la prévalence intra-cheptel varie entre 30-80% dans les régions affectées en Europe occidentale. Au sein d'un cheptel, il existe également une grande variation entre la proportion d'animaux infestés et la charge parasitaire de ces derniers. Il est impossible d'éradiquer *F.hepatica* mais il est possible de contrôler l'impact d'une infestation sur la production.

La surveillance et le contrôle de l'infestation d'un cheptel à un niveau acceptable et avec une perte minimale de la production sont une nouvelle façon de gérer la fasciolose.

SVANOVIR® *F.hepatica*-Ab est un kit immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre *F.hepatica* dans le sérum/plasma (individuel ou mélange jusqu'à 10 sérums), le jus de viande et le lait (individuel ou lait de tank) de bovin. La détection des anticorps de *F. hepatica* dans les échantillons mentionnés ci-dessus est un bon indicateur du niveau d'infestation, ce qui fait de cet outil un instrument intéressant pour déterminer la nécessité d'un contrôle vermifuge.

• PRINCIPE DU TEST

La méthode du kit repose sur un test immuno-enzymatique indirect en phase solide (ELISA). Les échantillons sont exposés à l'antigène *F.hepatica* inactivé dans les puits de la microplaque. Les anticorps anti-*F.hepatica* (si présents dans l'échantillon) se lient à l'antigène dans les puits. Le conjugué HRP ajouté forme un complexe avec ces anticorps anti-*F.hepatica*. L'excès non lié est éliminé par lavages avant l'ajout du substrat. Une couleur bleu-vert se développe. Elle est due à la conversion du substrat par le conjugué. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une couleur bleu-vert. La réaction est arrêtée par ajout de la solution stop. Le résultat est lu avec un spectrophotomètre pour microplaque et la densité optique (DO) est mesurée à 405nm.

• CONTENU DU KIT

Composants	Quantité
	Cat.No 104869
Microplaques Microplaque (96 puits) sensibilisée avec l'antigène non infectieux de <i>Fasciola hepatica</i> (scellée et gardée au sec)	2 (12 x 8 barrettes)
Conjugué Prêt à l'emploi (anticorps monoclonal anti-IgG de bovins conjugué à la peroxydase)	1 x 24mL
Solution de PBS Tween Concentrée 20 fois	1 x 125mL
Tampon de dilution échantillon Prêt à l'emploi	1 x 120mL
Solution de substrat ABTS - CONSERVER A L'OBSCURITE !	1 x 50mL
Solution stop Contient 1% SDS	1 x 25mL
A. Sérum de contrôle positif -Contient des agents conservateurs	1 x 2.5mL
B. Sérum de contrôle négatif -Contient des agents conservateurs	1 x 2.5mL

• SYMBOLES

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

• MATERIEL NON FOURNI

- Pipettes monocanales et multicanaux
- Lecteur d'absorbance pour microplaques équipé d'un filtre 405nm
- Embouts de pipette à usage unique
- Réservoirs à usage unique
- Eau distillée ou déionisée
- Plaques de prédilution

• PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

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. L'élimination des matériaux biologiques doit être réalisée dans le respect des réglementations locales, régionales et nationales.

• INFORMATION SUR LES ÉCHANTILLONS

Sérum individuel ou mélange de 10 : des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables.

Jus de viande : des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables. Le jus de viande est collecté en plaçant 5-10 g de muscle dans un sac à échantillon ou dans un autre récipient approprié. Conservez-le à -20°C pendant la nuit. En décongelant, le jus de viande va se former, presser doucement l'échantillon de viande pour libérer plus de jus si nécessaire.

Lait individuel ou de tank : des échantillons frais, réfrigérés ou congelés sont utilisables. Il est recommandé de centrifuger 15 minutes à 2000 x g pour éliminer la couche lipidique ou laisser les échantillons de lait reposer jusqu'à ce que la couche de matière grasse soit formée sur le dessus de l'échantillon. Pipeter sous la couche de graisse.

• RECOMMANDATIONS !

Le volume des réactifs est suffisant pour au moins 10 tests séparés.

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

• PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tampon PBS Tween

Diluer le PBS Tween 20 fois concentré au 1/20 dans de l'eau distillée. Préparer 500 ml par plaque en ajoutant 25ml de PBS Tween dans 475ml d'eau distillée et 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.

• PROTOCOLE

1. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante 18-25°C avant utilisation. Numéroté toutes les barrettes.

2. **Ajouter 100µl de contrôle positif** (Réactif A) et **de contrôle négatif** (Réactif B) en duplicat, dans les puits appropriés (*A1B1 et C1D1 par exemple*).

3. **Ajouter les échantillons :**

SÉRUM INDIVIDUEL et MÉLANGE de 10 SÉRUMS

Les échantillons de sérums (individuel ou mélange) sont testés dilués au 1/100. Dans une plaque de prédilution, distribuer 10µL d'échantillon dans les puits appropriés.

Ajouter 90µL de diluant échantillon dans chaque puits contenant des échantillons.

Transférer 10µL des échantillons prédilués dans la plaque de test dans les puits appropriés.

Ajouter 90µL de diluant échantillon dans chaque puits contenant des échantillons.

Continuer à l'étape 4.

JUS de VIANDE

Les échantillons de jus de viande sont testés dilués au 1/10. Dans la plaque de test, distribuer 10µL d'échantillon dans les puits appropriés.

Ajouter 90µL de diluant échantillon dans chaque puits contenant des échantillons.

Continuer à l'étape 4.

LAIT INDIVIDUEL ou de TANK

Les échantillons de lait sont testés purs. Dans la plaque de test, distribuer 100µL d'échantillon dans les puits appropriés.

Continuer à l'étape 4.

4. Agiter doucement, couvrir la plaque et incuber :

- **Serum individuel** : 1h à 37°C ou une nuit (16-20 heures) à 2-8°C.

- **Mélange de serum, jus de viande, lait individuel et lait de tank** : 1h à 37°C

5. Lavage :

Vider les puits et **laver 4 fois avec 300µL** de solution de lavage diluée. Lors du dernier lavage, vider la plaque et tapoter sur du papier absorbant afin d'éliminer toute trace de liquide. Cette étape peut être réalisée manuellement ou à l'aide d'un automate de lavage.

6. Conjugué

Distribuer 100µL de conjugué dans chaque puits.

Couvrir la plaque et incuber **1h à 37°C**.

7. Lavage :

Répéter l'étape 5. Lavage

8. Révélation :

Distribuer 100µL de substrat dans chaque puits.

Incuber la plaque **30 min à température ambiante (18-25°C) à l'obscurité**.

9. Arrêt de la réaction :

Arrêter la réaction en ajoutant 50µL de solution stop dans chaque puits en suivant le même ordre que lors de la distribution du substrat.

10. Lecture :

Mesurer la densité optique (DO) à l'aide d'un lecteur de plaque à **405nm** dans les 15minutes suivant l'arrêt de la réaction. S'assurer de l'absence de poussières et de bulles dans les puits.

• CALCULS

Calculer les valeurs moyennes des DO mesurées pour le contrôle négatif (CN) et le contrôle positif (CP).

Les valeurs de **DOR** pour chaque échantillon sont calculées selon la formule suivante :

$$DOR = \frac{DO_{\text{échantillon}} - \text{Moyenne DO}_{\text{CN}}}{\text{Moyenne DO}_{\text{CP}} - \text{Moyenne DO}_{\text{CN}}}$$

N.B. : Pour les échantillons de jus de viande, calculer la valeur de DOR moyenne pour 5 échantillons individuels avant d'interpréter les résultats des tests.

• CRITÈRES DE VALIDATION

Les résultats sont valides si les critères suivants sont remplis.

- DO contrôle positif / DO contrôle négatif > 3
- Les valeurs de DO des duplicats de contrôle positif ne doivent pas différer de plus de 25% de la valeur moyenne de ces duplicats.

Si l'un de ces critères n'est pas rempli, recommencer le test.

• INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Incubation courte (1 heure)

ÉCHANTILLON		DOR	INTERPRÉTATION
Sérum et lait individuel		< 0,4	Pas ou faible charge parasitaire dans le foie
		≥ 0,4	Infestation par la Douve du foie avec des pertes de production probables
Mélange de 10 sérums	Sondage au sein d'un cheptel (mélange jusqu'à 10 sérums au sein d'un lot)	< 0,2	Pas (ou faible risque) d'infestation du lot considéré
		≥ 0,2	Présence de Douve du foie dans le cheptel *
	Bilan d'élevage complet (tous les animaux d'un cheptel par mélange jusqu'à 10 sérums)	Si tous les mélanges ont une DOR < 0,2	Cheptel négatif (Pas ou faible charge parasitaire)
		Si au moins UN des mélanges a une DOR ≥ 0,2 <u>et</u> que TOUS les mélanges ont une DOR < 0,6	Cheptel infesté par la Douve du foie mais pas d'interférence avec la production globale
		Si au moins un mélange a une DOR ≥ 0,6	Cheptel infesté par la Douve du foie avec des pertes de production probables
Jus de viande		< 0,5	Pas ou faible charge parasitaire dans le foie
		≥ 0,5	Infestation par la Douve du foie avec des pertes de production probables
Lait de tank		< 0,3	Pas ou faible charge parasitaire dans le foie
		0,3 - 0,6	Contact avec la Douve du foie, pas d'interférence avec la production
		≥ 0,6	Infestation par la Douve du foie avec des pertes de production probables

Incubation longue (une nuit)

ÉCHANTILLON		DOR	INTERPRÉTATION
Sérum individuel		< 0,6	Pas ou faible charge parasitaire dans le foie
		≥ 0,6	Infestation par la Douve du foie avec des pertes de production probables

* Pour une estimation plus précise de l'impact de l'infestation du cheptel, il est nécessaire de la contrôler dans sa totalité.

Il est recommandé de contrôler les individus constituant les mélanges du lot en sérum individuel.

References

1. Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., Williams, D., Vercruysse, J. (2007): Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 78, 57-66
2. Charlier, J., De Cat, A., Forbes, A., Vercruysse, J. (2009): Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters. *Vet. Parasitol.* 166, 235-240.
3. Sohair, I. B and Eman, M.N. (2009): Histopathological and bacteriological studies on livers affected with fascioliasis in cattle. *J. Comp. Path. & Clinic. Path.*, 22, 19 – 45
4. Claridge J, Diggle P, McCann CM, Mulcahy G, Flynn R, McNair J, Strain S, Welsh M, Baylis M, Williams DJ. (2012): *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature communications*, DOI: 10.1038/ncomms1840.



*Produit par SVANOVA
Distribué par BIOSELLAL SAS
27 Chemin des Peupliers
69570 DARDILLY
FRANCE



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