



**DETECTAREA ANTICORPILOR SPECIFICI
AI PROTEINEI VP7 A VIRUSULUI BLUETONGUE
PRIN METODA ELISA COMPETIȚIE ÎN PROBE DE SER ȘI PLASMĂ**

(480 REACȚII)

**POURQUIER® ELISA BTV SER COMPETIȚIE MONOCUPULE
Versiune : P00450/07**

326 rue de la Galéra – Parc Euromédecine - 34097 Montpellier Cédex 5 – France
Tel 33(0)499.23.24.25 – Fax 33(0)467.04.20.25 - info@institut-pourquier.fr - <http://www.institut-pourquier.fr>



S.C. PHARMACHEM
CONTINENTAL S.R.L.
ROMÂNIA

1/1

INTRODUCERE

Boala limbii albastre (bluetongue) sau febra catarală a oilor este o boală virală ne-contagioasă a ovinelor, caprelor, bovinelor și rumegătoarelor sălbatice. Ea face parte din lista A a OIE. Bovinele și caprele prezintă rar simptome clinice în timp ce la ovine mortalitatea este ridicată. Boala este produsă de virusul bluetongue (BTV) care face parte din genul *Orbivirus* al familiei Reoviridae. Virusul se transmite printr-un țânțar hematofag din genul *Culicoides*. Transmiterea bolii de la un animal la altul nu este posibilă. Repartiția geografică a maladiei se limitează la teritoriile în care vectorul poate supraviețui, adică într-o zonă largă care se întinde între paralela de 45° nord și 35° sud și care are tendința să se extindă (Corsica și Sardinia sunt afectate din 2001).

Semnele clinice, discrete în cea mai mare parte, se traduc printr-o inflamație intensă care atinge mai întâi extremitatea cefalică, cu febră ridicată, congestia și edemul feței și al limbii, cu ulceratii și hemoragii pe mucoase. În cazurile mai severe, limba poate deveni cianotică (de unde și numele bolii), apar grave leziuni musculare, mortalitatea putând ajunge până la 15%.

O boală severă similară a rumegătoarelor sălbatice este cauzată de virusul bolii hemoragice epizootice (EHVD) care, ca și virusul bluetongue (BT), este un membru al familiei *Orbivirus* dar este clasată într-un serogrup diferit. EHD poate produce semne clinice similare celor produse de bluetongue. În genul *Orbivirus* există 14 serogrupuri diferite, iar serogrupul BT conține 24 serotipuri care se disting printre altele și prin virulența lor. Marea majoritate a serogrupurilor sunt distincte din punct de vedere imunologic dar există și reacții încrucișate între serogrupurile BT și EHD.

Răspunsul serologic apare la rumegătoare după 7-14 zile de la infecția cu BTV și este durabil.

Pentru detectarea anticorpilor specifici serogrupului BT s-au folosit teste serologice de imunodifuzie sau ELISA, dar acestea nu pot face diferența între anticorpii specifici ai serogrupurilor BT și EHD.

Prezentul test ELISA de competiție permite punerea în evidență a anticorpilor specifici ai BTV în probele individuale de ser și plasmă de la bovine, ovine și caprine.

El se bazează pe principiul competiției între anticorpii din serul de testat și un anticorp monoclonal marcat cu peroxidază. Acest anticorp monoclonal se fixează pe partea N-terminală a proteinei VP7, o proteină majoră a capsidei interne a virusului, specifică subgrupului BT.

Acest test utilizează o proteină recombinantă VP7 pusă la punct de departamentul de virusologie al AFSSA Maisson Alfort, France.

Această metodă este ușor de aplicat rapidă, fiabilă și se pretează în mod special pentru testarea unui mare număr de probe.

PRINCIPIUL TESTULUI

Principiul testului propus este următorul :

- 1) Proteina recombinantă VP7 este fixată pe fundul godeurilor microplăcilor de polistiren.
- 2) Serurile de testat se diluează și apoi se incubează în godeuri. Dacă există anticorpi specifici în seruri, se formează complexe imune antigen-anticorp.
- 3) După incubare, un anticorp monoclonal (anti-VP7) cuplat cu o enzimă se incubează în microplăci. În prezența anticorpilor specifici virusului BT în serurile de testat, siturile antigenului VP7 sunt mascate și conjugatul nu poate să se fixeze pe epitopul corespunzător. În caz contrar, conjugatul se poate fixa pe antigenul VP7
- 4) După o nouă spălare, un substrat enzimatic (TMB) pune în evidență prezența enzimei prin apariția culorii bleu, culoare care virează în galben după adăugarea soluției stop. Intensitatea culorii este în funcție de titrul anticorpilor din serul de testat.

Limita de pozitivitate este calculată în funcție de rezultatele obținute cu eșantionul de control negativ furnizat în trusă, eșantion care trebuie introdus în fiecare microplacă

DETECTABILITATEA KITULUI

Nu există un standard internațional pentru controlul detectabilității kiturilor serologice în bluetongue. Totuși, Laboratorul de referință pentru bluetongue din Franța CIRAD propune un standard numit J63 care trebuie detectat pozitiv în testul ELISA până la diluția 1/4.

CONTINUTUL
ROMÂNIA

APARATURĂ ȘI MATERIALE NECESARE LA REALIZAREA TESTULUI NEFURNIZATE ÎN KIT

- 1) Cititor de microplăci.
- 2) Centrifugă.
- 3) Tuburi de centrifugă
- 4) Sistem de agitare tip vortex
- 5) Sistem de spălare a microplăcilor ce permite distribuirea a 300μl pe godeu.
- 6) Micropipete de precizie și multicanal (precizia cerută pentru măsurare trebuie să fie inferioară sau egală cu 10% pentru volume inferioare sau egale a 10 μl și de 5% toate celelalte volume indicate).
- 7) Conuri de micropipete uzaj unic.
- 8) Apă distilată : apa utilizată pentru reconstituirea substanțelor de referință sau a soluțiilor de spălare poate fi produsă printr-un sistem de distilare convențional sau prin oricare alt sistem performant de purificare (osmoză inversă, purificare pe rezine și carbon activ, etc.).
- 9) Capace sau scotch pentru microplăci, hârtie de aluminiu.
- 10) Incubator de + 37°C (± 3°C).

CONȚINUTUL KITULUI ȘI MODUL DE CONSERVARE

Este recomandabil să se lucreze cu toți reactivii aduși la temperatura de + 21°C (± 5°C)). Pentru aceasta, este indicat ca reactivii să fie scoși din frigider cu cel puțin o oră înainte de a începe efectuarea testului (cu excepția conjugatului).

COMPONENTUL	CANTITATEA	MODUL DE CONSERVARE ȘI ALTE OBSERVAȚII
Microplăci sensibilizate monocupule	5	+ 5°C (± 3°C) - Dacă o placă nu este utilizată în totalitate, ea ar putea fi folosită ulterior dacă este pusă într-o pungă de plastic închisă etanș și conservată la + 5°C (± 3°C)
Soluție de spălare concentrată 20X	1 flacon de 100 ml	+ 5°C (± 3°C) - Soluția prezintă cristale la + 5°C (± 3°C) care vor dispărea rapid la + 21°C (± 5°C). O agitare ușoară din timp în timp accelerează dizolvarea cristalelor - Soluția poate fi conservată la + 21°C (± 5°C) până la o lună dacă este pusă în flacoane închise etanș (dacă se dorește utilizarea imediată) - După diluare, soluția poate fi conservată timp de 3 zile la + 5°C (± 3°C) - Soluția fiind identică pentru toate kiturile Institutului POURQUIER poate fi utilizată pentru oricare din aceste kituri
Tampon de diluție 2 verde deschis (pentru eșantioane)	1 flacon de 120 ml	+ 5°C (± 3°C) - Agitați înainte de utilizare
Eșantion pozitiv de control (lichid)	1 flacon de 1 ml	+ 5°C (± 3°C)
Eșantion negativ de control (lichid)	1 flacon de 1 ml	
Conjugat monoclonal anti-VP7-peroxidază	1 flacon de 4,00 ml	+ 5°C (± 3°C) - Soluția de conjugat diluată nu poate fi conservată.
Soluție de relevare 2 (substrat) în diluție de lucru (TMB)	1 flacon de 60 ml	+ 5°C (± 3°C)
Soluție stop (soluție H ₂ SO ₄ 0,5 M)	1 flacon de 120 ml	+ 5°C (± 3°C) - Soluția poate fi conservată la + 21°C (± 5°C) până la o lună dacă este pusă în flacoane închise etanș (dacă se dorește utilizarea imediată) - Soluția fiind identică pentru toate kiturile Institutului POURQUIER, ea poate fi utilizată pentru orice kit
Instrucțiuni de utilizare		

S.C. PHARMACHEM
CONTINENTAL S.R.L.
ROMÂNIA

PRECAUȚII DE FOLOSIRE

- 1) Nu pipetați reactivii cu gura.
- 2) Evitați contactul substratului (TMB)* cu pielea, mucoasele și ochii.
- 3) « **Soluția stop** » conține H_2SO_4 * 0,5M ce poate cauza arsuri grave în caz de contact cu pielea, mucoasele și ochii.
- 4) Deși materialul livrat în cofret nu conține nici un element contaminant, iar probele de ser sau plasma sunt teoretic neinfecțioase, este recomandabil ca, înainte de eliminare, să decontaminați tot materialul de uzaj unic folosit în cursul manipulărilor, fie prin imersie într-o soluție de hipoclorit de sodiu 5% preparată extemporaneu, fie prin autoclavare la 120°C, timp de 1 oră minimum sau printr-o altă metodă conformă cu reglementările în vigoare
- 5) Serurile de referință conțin azidă de sodiu* care poate fi toxică prin ingestie. Pe de altă parte ele pot conduce potențial la formarea de azide* metalice explozive sau să deterioreze canalizarea de cupru în momentul eliminării lor.

* Institutul POURQUIER pune la dispoziția celor interesați fișele de toxicitate ale acestor produse.

MODUL OPERATOR

1) DEPUNEREA PROBELOR

Urmăriți fig. 1 (conform notei 1 și 2)

- Depuneți :

- 80 μ l de „Tampon de diluție 2” în fiecare godeu
- 20 μ l eșantion de control pozitiv nediluat în godeul A1
- 20 μ l de eșantion de control negativ nediluat în godeurile B1 și C1 (vezi punctele 2 și 3)
- 20 μ l din fiecare eșantion (un singur godeu pe eșantionul de testat)

- Omogenizați conținutul godeurilor printr-o ușoară agitare a plăcilor
- Acoperiți placa (cu capac, hîrtie de aluminiu sau adeziv)
- Incubați **45 minute** (± 3 min) la **+21°C** ($\pm 5^\circ$ C)

A	P												
B	N												
C	1												
D	2												
E	3												
F	4												
G	5												
H	..	..											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

P = eșantion de control pozitiv
N = eșantion de control negativ
1 = eșantion de testat n°1
2 = eșantion de testat n°2
3 =

Figura 1 : depunerea eșantioanelor

Notă :

- 1) Umplerea individuală a celor 96 de godeuri poate fi câteodată cam lungă. În scopul standardizării timpului de incubare a probelor, noi preparăm eșantioanele de control și eșantioanele de testat într-o microplacă de 96 avînd godeuri cu fundul în formă de U. În acest fel este posibil să le transferăm rapid, coloană după coloană, cu ajutorul unei pipete multicanal. Este însă indispensabil ca diluția serurilor de testat să se facă în aceeași manieră ca diluția serurilor de referință.
- 2) Dispoziția eșantioanelor de control în A1 și B1, este indiferentă, ele putînd fi plasate oriunde în plăci. Este preferabil ca ele să fie testate în mai multe godeuri pentru calculul valorii DO medie. Este bine să depuneți un control pozitiv și un control negativ în centrul plăcii.

S.C. PHARMACHEM
CONTINENTAL S.R.L.
ROMANIA

Ag -

2) DEPUNEREA CONJUGATULUI

- a) Diluați un flacon de « Soluție de spălare concentrată 20x » în 1900 ml apă distilată. Această soluție este numită de acum încolo « Soluție de spălare »
- b) Diluați conjugatul **1/20** în «Soluția de spălare»
- c) Depuneți direct (**fără să spălați sau să goliți godeurile**) 100 µl de conjugat diluat în fiecare godeu.
- d) Acoperiți plăcile (cu capac pentru plăci, folie de aluminiu sau scotch adeziv) și incubați-le timp de **45 minute** (± 3 minute) la **+21°C** ($\pm 5^\circ\text{C}$).

4) SPĂLAREA

- a) Eliminați conținutul plăcilor prin răsturnare sau cu ajutorul unui dispozitiv automat sau semiautomat.
- b) Umpleți totalitatea godeurilor plăcilor cu soluția de spălare și apoi eliminați din nou această soluție.
- c) Repetați de 2 ori această operație (deci 3 spălări în total)

Notă :

- *Atenția acordată ultimei spălări este de o importanță capitală pentru buna realizare a testului.*
 - *Dacă executați o spălare manuală, puteți ca după ultima spălare să tamponați plăcile cu fața în jos pe o hârtie absorbantă curată în scopul eliminării în totalitate a conținutului din godeuri.*
- 1) *Dacă se tratează simultan un mare număr de plăci, în scopul sincronizării operațiunilor, puteți lăsa plăcile umplute cu soluția de spălare până la 1 oră, fără ca aceasta să influențeze validitatea testului.*

5) REVELAREA

- a) Depuneți 100 µl de «Soluție de revelare 2» în fiecare godeu.
- b) Incubați plăcile timp de **10 minute la + 21°C** ($\pm 5^\circ\text{C}$) la întuneric.
- c) Depuneți 100 µl de «Soluție stop» în fiecare godeu.
- d) Agitați ușor plăcile până la omogenizarea soluției colorate. Ștergeți cu atenție fundul plăcilor.

Notă :

- 1) *Cele 10 minute de revelare indicate în modul de folosire au dat în laboratorul nostru o DO conformă cu cea prevăzută în capitolul «Interpretare». Precizăm că nivelul de revelare poate fi condiționat de diferiți factori: calitatea spălărilor, precizia pipetajului, condițiile de temperatură a reacției. În funcție de condițiile de lucru, etapa de revelare poate duce la DO mai mari sau mai mici față de cele așteptate. De aceea, utilizatorul poate să sîmpeze reacția 10 de minute ± 5 minute*
- 2) *Citirea plăcilor poate fi făcută până la 1 oră după stopare cu condiția ca plăcile să fie ținute la întuneric.*

6) CITIREA

Înregistrați densitățile optice la 450 nm (DO. 450). Punctul zero («blancul») spectrofotometrului se măsoară la 450 nm față de aer.

Calculați pentru fiecare eșantion procentajul S/N față de eșantionul de control negativ

Această valoare se obține în felul următor :

$$\% \text{ S/N} = (\text{DO. 450 a eșantionului de testat} / \text{DO. 450 a eșantionului de control negativ}) \times 100$$

S.C. PHARMACHEM
CONTINENTAL S.R.L.
ROMÂNIA



CRITERII DE VALIDARE

Reacția este validată dacă :

- eșantionul de control negativ are o valoare a DO. 450. de minim **0,700** și maxim de **3,00**
- procentajul de competiție al eșantionului de control pozitiv este mai mic de **20%**

INTERPRETARE

- Probele al căror procentaj de inhibiție este superior sau egal cu **80 %** sunt considerate ca provenind de la un animal care nu este purtător de anticorpi specifici BTV
- Probele al căror procentaj de inhibiție este cuprins între **70% și 80%** sunt considerate dubioase
- Probele al căror procentaj de inhibiție este inferior sau egal cu **70%** sunt considerate ca provenind de la un animal care este purtător de anticorpi specifici BTV.

Notă :

- 1) *Este indicat pentru serurile individuale care prezintă un procentaj de inhibiție situat în zona dubioasă să fie reconfirmate printr-o testare efectuată după o nouă priză de sânge sau printr-o altă metodă*

Tablou recapitulativ

Procentaj de competiție	Interpretare
≥ 80%	Negativ
70% - 80%	Dubios
≤ 70%	Pozitiv

SEMNIFICAȚIA IDEOGRAMELOR

☉ : Modificare majoră a modului de folosire (modificare a modului operator, a criteriilor de validare, sau a regulilor de interpretare)

✎ : Modificare minoră a modului de folosire (sfaturi practice)

BIBLIOGRAFIE

- Zientara, S., De la Rocque, S., Gourreau, J.M., Gregory, M., Diallo, A., Hendrikx, P., Libeau, G., Sailleau, C., Delecolle, J.C.,
La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000. Epidemiol. Et Sante anim. 2000 ; 38, 133-144.
- Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, Roquier C, Remond EM, Lebreton F, Hammoumi S, Dubois E, Agier C, Merle G, Bread E.
Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome.
Vet. Rec. 2002 May 11; 150(19) : 598-601.
- Breard E, Sailleau C, Coupier H, Mure-Ravaud K, Hammoumi S, Gicquel B, Hamblin C, Dubourget P, Zientara S.
Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain.
- **Manuel of Standards for diagnostic tests and vaccines**, page 195-210, fifth edition, 2004, OIE, Paris

S.C. PHARMACHEL
CONTINENTAL S.R.L.
ROMÂNIA

POURQUIER® BLUETONGUE COMPETITION

Ser competiție - 480 Teste

DETECTIA ANTICORPILOR VIRUSULUI BLUETONGUE PRIN ELISA

Componentele setului

- 5
1 x 100 ml Microplăci sensibilizate
1 x 120 ml Soluție spălare, concentrat 20x
1 x 1 ml Tampon de diluție 2
1 x 1 ml Martor pozitiv
1 x 1 ml Martor negativ
1 x 4 ml Conjugat, anti-BTV
1 x 60 ml Substrat, TMB 2
1 x 120 ml Soluție de stopare (H₂SO₄)
Instrucțiuni de utilizare

LOT

8

ivD

2°C 8°C

LOT

⌚ :

Cod produs: P00450-2

INSTITUT POURQUIER - 326 RUE DE LA GALERA - 34097 MONTPELLIER CEDEX 5 - FRANȚA
TEL: 33.(0)4.99.23.24.25 - FAX: 33.(0)4.67.04.20.25

ELISA

A se păstra la +5°C (±3°C)

SOLUȚIE SPĂLARE 20x

1

(100 ml)

Lot: 1-093

Exp.: 07/11

Diagnostic in-vitro

Institut Pourquier - FRANȚA

ELISA

A se păstra la +5°C (±3°C)

TAMPON DE DILUȚIE

2

(120 ml)

Lot: 2-423

Exp.: 06/11

Diagnostic in-vitro

Institut Pourquier - FRANȚA

ELISA

A se păstra la +5°C (±3°C)

SOLUȚIE DE STOPARE

2

(120 ml)

Lot: 2-423

Exp.: 06/11

Coroziv - provoacă arsuri grave

Institut Pourquier - FRANȚA

Diagnostic in-vitro

BLUETONGUE COMPETITION

4 ml

Conjugat

Lot 24-298

Exp. 06/11

Institut POURQUIER

A se păstra la +5°C (±3°C)
Diagnostic in-vitro

BLUETONGUE COMPETITION

Pos 1 ml

Martor

Lot 862

Exp. 09/11

Institut POURQUIER

A se păstra la +5°C (±3°C)
Diagnostic in-vitro

BLUETONGUE COMPETITION

Neg. 1 ml

Martor

Lot 863

Exp. 09/11

Institut POURQUIER

ELISA

**TMB SUBSTRAT
SOLUȚIE REVELATOARE**

2

60 ml

Lot: 2-212 Exp.: 07/11

Institut POURQUIER - FRANȚA

Diagnostic in-vitro

S.C. PHARMACHEM
CONTINENTAL S.R.L.
ROMÂNIA