

Test d'anticorps de la tuberculose bovine Enferplex

01I17 (460 tests)

Test de dépistage *in vitro* des anticorps dirigés contre *Mycobacterium bovis* dans le sérum et, de manière provisoire, dans le lait

Strictement réservé au diagnostic vétérinaire *in vitro*

Fabriqué et distribué par :
Enfer Scientific,
Unit T, M7 Business Park,
Newhall, Naas,
Co. Kildare.
Irlande
Tél. : +353 459 83800



Validé et certifié par l'OIE comme pertinent pour les utilisations définies dans ce document.
Numéro d'approbation OIE : 20190113

Table des matières

1.0	Renseignements généraux.....	3
2.0	Utilisation prévue	3
3.0	Principe de la procédure.....	4
4.0	Réactifs.....	4
5.0	Matériaux et équipements nécessaires, non fournis	4
6.0	Mises en garde et précautions	5
7.0	Informations sur la santé et la sécurité	5
8.0	Préparation des réactifs	6
9.0	Préparation de l'échantillon et du témoin	6
10.0	Protocole de test	7
11.0	Résultats.....	7
12.0	Limites de la procédure	8
13.0	Disposition recommandée pour les plaques	8

1.0 Renseignements généraux

L'agent pathogène *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) est responsable d'une grave zoonose dite « tuberculose bovine ». Bien qu'elle présente un large spectre d'hôtes et affecte la plupart des espèces mammifères, la tuberculose bovine a été initialement observée chez les animaux domestiques. En dehors du bétail et des mammifères ongulés sauvages, la maladie a été observée chez les éléphants, les primates non humains et de nombreuses autres espèces (1). Indépendamment de ses mécanismes pathogéniques, la capacité de *M. bovis* à infecter une aussi grande variété d'espèces est imputable aux différentes voies par lesquelles *M. bovis* peut se transmettre d'un animal à un autre, qui explique comment la maladie est devenue endémique dans de nombreux pays (2, 3).

2.0 Utilisation prévue

Certifié par l'OIE en mai 2019 comme pertinent pour la détection des anticorps dirigés contre *Mycobacterium bovis* dans les échantillons de sérum bovin, en tant que test auxiliaire réalisé en association avec d'autres méthodes d'étude de la prévalence sérologique, ou de diagnostic et de gestion de l'infection causée par *M. bovis* au sein de troupeaux, pour les objectifs suivants :

1. Confirmer, mais non invalider, un diagnostic de cas suspects ou cliniques, y compris la confirmation de tests de dépistage positifs chez des animaux et dans des troupeaux où le taux de prévalence de l'infection va de très faible à élevé, en fonction de la détection d'anticorps dans le sérum bovin.
2. Détecter les animaux infectés par *M. bovis* non positifs au test d'intradermotuberculation comparative ou au test de détection de l'interféron gamma (IFN γ), en fonction de la détection d'anticorps dans le sérum bovin.
3. Confirmer, mais non invalider, une infection chez des animaux présentant des réactions douteuses au test d'intradermotuberculation comparative, en fonction de la détection d'anticorps dans le sérum bovin.
4. Comme test de dépistage pour identifier les animaux les plus susceptibles de présenter des lésions visibles (LV) en établissant le nombre d'antigènes de *M. bovis*, reconnus par des animaux séropositifs à la tuberculose bovine.

Certifié par l'OIE en mai 2022 comme pertinent pour la détection des anticorps dirigés contre *Mycobacterium bovis* dans les échantillons de lait bovin, en tant que test auxiliaire réalisé en association avec d'autres méthodes d'étude de la prévalence sérologique, ou de diagnostic et de gestion de l'infection causée par *M. bovis* au sein de troupeaux, pour les objectifs suivants :

1. Confirmer, mais non invalider, un diagnostic de cas suspects ou cliniques, y compris la confirmation de tests de dépistage positifs chez des animaux et dans des troupeaux, en fonction de la détection d'anticorps dans des échantillons individuels de lait bovin, à l'exception des échantillons de colostrum et de premier lait réalisés au cours des 4 premiers jours suivant le vêlage.
2. Comme test de dépistage pour identifier les infections causées par *M. bovis* au sein des troupeaux en fonction de la détection d'anticorps dans les échantillons de lait en réservoir, à l'exception des échantillons de colostrum et de premier lait réalisés au cours des 4 premiers jours suivant le vêlage.

Espèces et spécimens :

Ce test est validé et approuvé pour l'analyse d'échantillons de sérum provenant de bovins, comme indiqué ci-dessus. Concernant l'utilisation prévue au point 4 ci-dessus, lors des 5 premières années après l'enregistrement, des données supplémentaires seront nécessaires pour mieux qualifier et catégoriser la relation entre le nombre d'antigènes de *M. bovis* et la probabilité de lésions visibles. Ce test est également approuvé de manière provisoire pour l'analyse d'échantillons de lait provenant de bovins comme test de dépistage du troupeau, ou comme test de confirmation complémentaire à utiliser sur les animaux individuels, lorsqu'il est réalisé en association avec d'autres méthodes de diagnostic et de gestion de l'infection causée par *M. bovis*.

3.0 Principe de la procédure

Le test de dépistage des anticorps de la tuberculose (TB) bovine Enferplex™ est un dosage immunoenzymatique qualitatif qui s'effectue par l'ajout successif de lait ou de sérum bovin sur une plaque tapissée de plusieurs antigènes, d'un conjugué anticorps-enzyme et d'un substrat chimiluminescent.

Lors de l'incubation de l'échantillon dans le puits tapissé de plusieurs antigènes, les anticorps dirigés contre *M. bovis* forment des complexes avec les antigènes immobilisés.

Cette étape est suivie d'un lavage à l'aide d'une solution tampon 1X et d'IgG ovine anti-bovine marquée à la HRP (peroxydase de raifort), formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-HRP. Ensuite, le conjugué non lié est rincé et un substrat chimiluminescent est utilisé pour générer le signal et permettre l'acquisition d'une image. Cette image est analysée et les données sont réduites pour déterminer le statut de l'échantillon au moyen de la macro de TB bovine Enferplex.

4.0 Réactifs

La trousse de réactifs 01117 permet de réaliser 460 tests. Température de conservation : 2 à 8 °C. Respecter les conditions de conservation pour chaque composant.

Contenu du kit	Quantité et conditions de conservation
Plaque absorbante d'anticorps de la tuberculose bovine Plaques de microtitrage (96 puits) tapissées d'antigènes spécifiques de la bactérie <i>Mycobacterium bovis</i>	5 x 96 puits 2-8 °C (dans des étuis d'aluminium scellés)
Tampon de lavage 20X Concentré 20X	1 x 500 ml 2-8 °C
Dose repère de diluant d'échantillon Prêt à l'emploi	2 x 500 ml 2-8 °C
Dose repère de diluant du conjugué Prêt à l'emploi	1 x 500 ml 2-8 °C
Conjugué bovin concentré Non dilué	1 x 0,1 ml 2-8 °C
Multi-Lite A Substrat chimiluminescent pour la peroxydase en association avec Multi-Lite B	1 x 15 ml Température ambiante (+15 à 25 °C)
Multi-Lite B Substrat chimiluminescent pour la peroxydase en association avec Multi-Lite A	1 x 15 ml Température ambiante (+15 à 25 °C)
Témoin négatif à la TB bovine Sérum bovin négatif non dilué contenant un agent de conservation	1 x 0,1 ml -20 °C
Témoin positif à la TB bovine Sérum bovin non dilué contenant un agent de conservation	1 x 0,1 ml -20 °C

5.0 Matériaux et équipements nécessaires, non fournis

- Incubateur/agitateur de microplaques thermorégulé à 37 °C ± 2 °C avec une capacité d'agitation de 900 tr/min
- Imager Quansys Biosciences Q-View ou équivalent
- Dispositif de fourniture et d'aspiration de la solution de lavage
- Eau de qualité élevée distillée, déionisée ou obtenue par osmose inverse
- Couvercles hermétiques des microplaques et plateaux de distribution des réactifs
- Micropipettes de précision monocanal et multicanaux, d'un volume approprié, avec pointes à usage unique
- Récipients en verre ou en polypropylène pour la dilution du conjugué concentré et des autres réactifs
- Tubes/plaques en polypropylène pour la dilution de l'échantillon

6.0 Mises en garde et précautions

- 6.1 Respecter les consignes ; ne pas modifier la procédure de test ; ne pas remplacer les réactifs par ceux d'un autre fabricant. Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration indiquée et ne pas mélanger les composants de kits provenant de lots distincts.
- 6.2 Se référer à la fiche de données de sécurité du fabricant et à l'étiquetage des produits pour des informations sur les composants potentiellement dangereux.
- 6.3 Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon.
- 6.4 Attendre que les réactifs soient à température ambiante (TA), (+15 °C à 25 °C). Immédiatement après utilisation, ranger tous les réactifs conformément à leurs conditions de conservation respectives.
- 6.5 Éviter toute contamination croisée de la solution Multi-Lite par la solution du conjugué dilué. Ne pas verser la solution Multi-Lite inutilisée dans les bouteilles de Multi-Lite.
- 6.6 Ne pas poser les plaques plus de 3 minutes entre les étapes de lavage et l'ajout de réactifs.
- 6.7 Ne pas exposer la solution de substrat à une lumière intense ni à des agents oxydants.
- 6.8 Tous les réactifs doivent être préparés dans des verres propres ou des bouteilles en polypropylène. Des mesures doivent être prises pour éviter toute contamination croisée des réactifs. Utiliser des plateaux de distribution distincts pour chaque réactif.
- 6.9 Tous les matériaux biologiques inutilisés doivent être éliminés conformément à la réglementation locale, régionale et nationale en vigueur.

7.0 Informations sur la santé et la sécurité

Le tampon de lavage 20X ainsi que le témoin positif et le témoin négatif à la tuberculose bovine doivent être manipulés avec précaution. Prendre connaissance des dangers mentionnés sur l'étiquette de chaque emballage. Le tampon de lavage 20X ainsi que le témoin positif et le témoin négatif à la tuberculose bovine contiennent du 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one, une substance classée conformément à la directive 1272/2008/CE Sensibilisation cutanée 1 – H317. Les mentions de danger (phrases H) et conseils de prudence (phrases P) appropriés sont énumérés ci-dessous.



H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P272 Les vêtements de travail contaminés ne doivent pas sortir du lieu de travail.

P302 et P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau savonneuse.

P321 Traitement spécifique (voir sur cette étiquette).

P333 et P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.

P363 Laver les vêtements contaminés avant réutilisation.

La dose repère de diluant d'échantillon et la dose repère de diluant du conjugué doivent être manipulées avec précaution. Prendre connaissance des dangers mentionnés sur l'étiquette de chaque emballage. La dose repère de diluant d'échantillon et la dose repère de diluant du conjugué contiennent du sérum de chèvre donneuse classé conformément à la directive 1272/2008/CE [CLP] Sensibilisation respiratoire 1 – H334. Les mentions de danger (phrases H) et conseils de prudence (phrases P) appropriés sont énumérés ci-dessous.



H334 - Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.

Conseils de prudence (CLP)

P261 - Éviter de respirer les vapeurs, brouillards ou aérosols.

P272 - Les vêtements de travail contaminés ne doivent pas sortir du lieu de travail.

P280 - Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux.

P284 - [Lorsque la ventilation du local est insuffisante] porter un équipement de protection respiratoire.

P302+P352 - EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau.

P304+P340 - EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut respirer confortablement.

P321 - Traitement spécifique (voir section 4 de la présente FDS).

P333+P313 - En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.
 P342+P311 - En cas de symptômes respiratoires : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
 P362+P364 - Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.
 P501 - Éliminer le contenu/réceptacle dans un point de collecte des matières ou déchets dangereux, conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et/ou internationale.
 Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur demande.

8.0 Préparation des réactifs

Composant	Conservation du composant préparé
Tampon de lavage (1X) à la concentration de travail 1. Diluer le tampon de lavage 20X à 1/20 dans de l'eau déionisée. Préparer 500 ml par plaque en ajoutant 25 ml de tampon de lavage 20X à 475 ml d'eau déionisée et bien mélanger.	1 mois à TA (+15 à 25 °C) ou entre 2 et 8 °C
Conjugué à la concentration de travail pour les tests sur le lait et sur le sérum 1. Préparer uniquement le volume nécessaire au nombre de tests à réaliser. 2. Diluer le conjugué bovin concentré dans la dose repère de diluant du conjugué à 1:20000. Mélanger par retournement. 3. Par exemple, ajouter 2 µl à 40 ml de dose repère de diluant du conjugué.	Utiliser dans les 2 heures suivant la préparation.
Solution de travail Multi-Lite 1. Préparer uniquement le volume nécessaire au nombre de tests à réaliser. 2. Ajouter 1 dose de Multi-Lite A à 1 dose de Multi-Lite B dans un verre propre ou un récipient en plastique. Mélanger par retournement. 3. Ajouter par exemple 1 ml de Multi-Lite A dans 1 ml de Multi-Lite B. Mélanger par retournement.	Conserver la solution Multi-Lite entre +15 et 25 °C à l'abri de la lumière et utiliser dans les 30 minutes suivant la préparation.

9.0 Préparation de l'échantillon et du témoin

Attendre que tous les échantillons soient à température ambiante avant de réaliser le test. Tous les échantillons et témoins doivent être ajoutés à la plaque absorbante d'anticorps de la tuberculose bovine simultanément. Par conséquent, il est recommandé d'utiliser une plaque de transfert/plaque mère pour ajouter échantillons et témoins, puis de les transférer sur la plaque absorbante d'anticorps de la tuberculose bovine.

9.1 Témoins

- 9.1.1 Vérifier que les témoins négatifs et positifs sont bien mélangés avant de les ajouter à la dose repère de diluant d'échantillon.
- 9.1.2 Préparer les témoins à un taux de dilution de 1:200 en ajoutant, par exemple, 5 µl du témoin à 1 ml de la dose repère de diluant d'échantillon.
- 9.1.3 Mélanger le témoin préparé par retournement ou en pipettant 2 fois au minimum.
 - 9.1.4 Ajouter 50 µl du témoin négatif de la TB bovine à A1 et B1 de la plaque de test.
 - 9.1.5 Ajouter 50 µl du témoin positif de la TB bovine à C1 et D1 de la plaque de test.

9.2 Échantillons de sérum

- 9.2.1 Le sérum frais, réfrigéré ou précongelé peut être testé. Des sérums ictériques, lipémiques, hémolysés, traités thermiquement et contaminés peuvent fausser les résultats et ne doivent pas être utilisés.
- 9.2.2 Si les échantillons ne sont pas immédiatement testés, ils doivent être placés au réfrigérateur entre 2 et 8 °C. Pour une conservation pendant plus de 24 heures, congeler le sérum à une température inférieure ou égale à -20 °C.
- 9.2.3 Les échantillons contenant un précipité peuvent fournir des résultats incohérents et doivent donc être clarifiés avant le test.

- 9.2.4 Vérifier que l'échantillon de sérum est bien mélangé avant de l'ajouter à la dose repère du diluant d'échantillon.
- 9.2.5 Préparer les échantillons à un taux de dilution de 1:200 en ajoutant, par exemple, 5 µl de sérum à 1 ml de la dose repère de diluant d'échantillon.
- 9.2.6 Mélanger l'échantillon préparé par retournement ou en pipettant 2 fois au minimum.

9.3 Échantillons de lait individuels

- 9.3.1 Le lait frais, réfrigéré ou précongelé peut être testé. Les échantillons de lait présentant toute forme de décomposition ou de contamination peuvent fausser les résultats et ne doivent pas être utilisés.
- 9.3.2 Les échantillons de lait entier peuvent être utilisés après centrifugation pendant 15 minutes à 2 000 x g ou après décantation au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C) pour ôter la matière grasse. Aucun prétraitement n'est requis pour le lait écrémé.
- 9.3.3 Si les échantillons ne sont pas immédiatement testés, ils doivent être placés au réfrigérateur entre 2 et 8 °C. Pour une conservation pendant plus de 24 heures, congeler le lait à une température inférieure ou égale à -20 °C.
- 9.3.4 Préparer les échantillons de lait individuels à un taux de dilution de 1:5 en ajoutant, par exemple, 20 µl du lait individuel à 100 µl de la dose repère de diluant d'échantillon.
- 9.3.5 Mélanger l'échantillon préparé par retournement ou en pipettant 2 fois au minimum.

9.4 Échantillons de lait en vrac

- 9.4.1 Les échantillons de lait entier peuvent être utilisés après centrifugation pendant 15 minutes à 2 000 x g ou après décantation au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C) pour ôter la matière grasse. Aucun prétraitement n'est requis pour le lait écrémé.
- 9.4.2 Le lait frais, réfrigéré ou précongelé peut être testé. Les échantillons de lait présentant toute forme de décomposition ou de contamination peuvent fausser les résultats et ne doivent pas être utilisés.
- 9.4.3 Si les échantillons ne sont pas immédiatement testés, ils doivent être placés au réfrigérateur entre 2 et 8 °C. Pour une conservation pendant plus de 24 heures, congeler le lait à une température inférieure ou égale à -20 °C.
- 9.4.4 Préparer les échantillons de lait en vrac à un taux de dilution de 1:1 en ajoutant, par exemple, 50 µl de lait en vrac à 50 µl de la dose repère de diluant d'échantillon.
- 9.4.5 Mélanger l'échantillon préparé par retournement ou en pipettant 2 fois au minimum.

10.0 Protocole de test

- 10.1 Préparer les échantillons et les témoins comme décrit ci-dessus (il est recommandé d'utiliser une plaque de transfert/plaque mère).
- 10.2 Le témoin négatif et le témoin positif à la TB bovine sont à distribuer dans 2 puits chacun.
- 10.3 Tous les échantillons sont à tester une seule fois.
- 10.4 Transférer 50 µl des témoins et échantillons dans les puits correspondants de la plaque tapissée et couvrir la plaque d'un couvercle hermétique.
- 10.5 Incuber la plaque, secouer pendant 60 minutes à 37 ±2 °C.
- 10.6 Rincer les puits 6 fois avec 250-300 µl de tampon de lavage 1X. Vérifier que tous les puits sont parfaitement remplis, puis les vider intégralement. Ne pas modifier les étapes de lavage recommandées. Tout lavage inadéquat peut fausser les résultats.
- 10.7 Sécher par retournement sur du papier absorbant.
- 10.8 Ajouter 50 µl de conjugué à la concentration de travail dans chacun des puits. Sceller la plaque et l'incuber en la secouant pendant 60 minutes à 37 ±2 °C.
- 10.9 Rincer les puits 6 fois avec 250-300 µl de tampon de lavage 1X et sécher par retournement sur du papier absorbant.
- 10.10 Ajouter 50 µl de la solution de substrat dans chaque puits de la microplaque. Lire immédiatement la plaque dans l'imageur Quansys Biosciences Q-View paramétré à 220 secondes.

11.0 Résultats

11.1 Validation de la performance du test

Chaque plaque doit être prise en compte séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats du dosage. Les résultats du témoin doivent être validés avant de pouvoir interpréter les résultats de l'échantillon. Les critères des témoins positif et négatif à la TB bovine sont tous

inclus dans la macro de TB bovine Enferplex fournie et les résultats sont calculés automatiquement.

11.2 Plage de résultats acceptable pour les témoins

Si les critères des témoins ne sont pas respectés, le dosage n'est pas valable et doit être renouvelé.

11.3 Interprétation des résultats

La macro de TB bovine Enferplex garantit un test d'une spécificité et d'une sensibilité élevées.

Règle des 2 antigènes

Les échantillons fournissant un résultat négatif dans la macro sont considérés comme non réactifs au test de dépistage de la TB bovine Enferplex, c'est-à-dire qu'aucun échantillon n'est positif pour 2 antigènes ou plus, avec une spécificité et une sensibilité élevées.

Règle des 2 antigènes

Les échantillons fournissant un résultat positif dans la macro sont considérés comme réactifs au test de dépistage de la TB bovine Enferplex, c'est-à-dire qu'un échantillon est positif pour 2 antigènes ou plus, avec une spécificité et une sensibilité élevées.

12.0 Limites de la procédure

Comme pour tout test biologique, le présent test peut fournir un faux positif ou un faux négatif selon les conditions de réalisation. Comme pour tous les résultats des tests de dépistage de la tuberculose (TT, Gamma Interféron, etc.), l'exposition et la réponse potentielles aux *mycobactéries* environnementales doivent être interprétées en fonction des informations cliniques, historiques et épidémiologiques disponibles concernant les animaux testés. Toute modification apportée à la procédure peut fausser les résultats. *Enfer Scientific ne pourra être tenu responsable de toute perte ou tout dommage résultant de quelque manière que ce soit de l'interprétation des résultats d'un test.*

13.0 Disposition recommandée pour les plaques

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	S05	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85
B	NC	S06	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86
C	PC	S07	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
D	PC	S08	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
E	S01	S09	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
F	S02	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
G	S03	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
H	S04	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92

NC = témoin négatif à la TB bovine

PC = témoin positif à la TB bovine

S = échantillons testés une seule fois

C301I17GB mars 2022

Références

- Greenwald, R., Lyashchenko, O., Esfandary, J., Miller, M., Mikiere, S., Olsen, J.H., Ball, R., Dumonceaux, G., Schmitt, D., Moller, T., Payeur, J.B., Harris, B., Sofrenko, D., Waters, W.R., Lyashchenko, K.P. 2009. Highly accurate antibody assays for the early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clin. Vaccine Immun.* 16, 605-612
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003 100 (13), 7877-82
- More, S.J., Good, M., 2015. Understanding and managing bTB risk, perspectives from Ireland. *Vet. Microbiol.* 176, 209-218.