MODE OPERATOIRE

Entretien des lignées cellulaires

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode décrit les modalités mises en œuvre pour l'entretien des cellules en lignées (notamment IB-RS-2, Vero et BHK-21), ainsi que leur congélation et leur décongélation.
L'utilisation de la cellule de Malassez pour le comptage des cellules est également décrite.

2. REFERENCES NORMATIVES

sans objet.

3. DEFINITIONS

DMSO : Diméthyl sulfoxide
MEM : Earle's Minimum Essential Medium
SVF : Sérum de Veau Foetal

4. PRINCIPE DE LA METHODE

Les cellules en culture utilisent les nutriments présents dans le milieu de culture pour leur croissance et multiplication. Lorsque le tapis cellulaire atteint la confluence, les cellules doivent être réensemencées à une plus faible densité. Cela correspond aux étapes de dissociation du tapis cellulaire au moyen d'enzyme, au lavage éventuel (centrifugation et reprise du culot) des cellules dissociées, puis à l'ensemencement de nouvelles boîtes de culture dans un milieu de culture complet.
Les cellules en culture conservent leur propriété (notamment sensibilité à un agent viral) pendant un nombre de passages limité, variable selon le type cellulaire et/ou l'agent viral recherché. Il est donc important de connaître la limite d'utilisation des cellules afin de pouvoir toujours disposer de cellules sensibles.

5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- poste de sécurité microbiologique (PSM) de classe II
- enceintes réfrigérées :- 20 °C (+/- 5°C), - 80 °C (+/-5°C) et + 5 °C (± 3 °C)
- enceintes thermostatique: à + 37 °C (± 2 °C)
- centrifugeuse réfrigérée
- microscope inversé et droit
- petit matériel courant de laboratoire (stérile) : erlenmeyers avec bouchons, béchers, éprouvettes graduées, tubes de centrifugation avec bouchons, microtubes de 1,5ml, cryotubes de 2ml, pipettes, barreau magnétique …
- cellule de comptage (Malassez ou autre)

- Container pour conservation en azote liquide
- boîtes pour culture cellulaire (25cm2, 75cm2 ou/et 150cm2)
- matériel de pipetage
- Agitateur vibrant et agitateur magnétique
- Minuteur
- Boite de congélation contenant de l'isopropanol

6. REACTIFS ET PRODUITS

- Milieu de culture MEM Earl's Ref 31095-029 (Gibco Invitrogen)
- Milieu de culture IMDM + Glutamax réf 31980 (Gibco)
- Milieu de culture DMEM/F-12 réf 31330 (Gibco)
- Sérum de veau fœtal (SVF) Ref. 2E14-802F (Lonza)
- Antibiotiques : flacons de mélange d'antibiotiques de chez Gibco (Invitrogen, Ref 15140-122) ; composition du mélange = Penicillin G Sodium à 10 000 unités par ml et Streptomycine à 10 000 µg par ml.
- Autres compléments : acides aminés non essentiels Ref 11140-035 (Gibco Invitrogen), hydrolysat de lactalbumine Ref.L-9010 (Sigma), pyruvate de sodium Ref. 11360-039 (Gibco Invitrogen)
- Trypsine-EDTA Ref.25300-054 (Gibco Invitrogen)
- Solution de bleu Trypan à 0,4%réf : T8154 (Sigma)DMSO Ref D-8418 (Sigma)

7. PREPARATION DES REACTIFS

Pour BHK-21 :
Préparer un flacon de milieu de culture complet. Dans un flacon de 500ml de milieu ajouter un mélange d'antibiotiques réf.15140-122 (Gibco Invitrogen), à une concentration finale de Penicillin G Sodium de 60 unités par ml et Streptomycine de 60 µg par ml), acides aminés non essentiel en MEM (100x) à 1% pyruvate de sodium (100mM) à 1% et 10% SVF.

Pour VERO :
Préparer un flacon de milieu de culture complet. Dans un flacon de 500ml de milieu ajouter un mélange d'antibiotiques réf.15140-122 (Gibco Invitrogen), à une concentration finale de Penicillin G Sodium de 60 unités par ml et Streptomycine de 60 µg par ml), pyruvate de sodium (100mM) à 1% et 5% SVF.

Pour IB-RS-2 (clone 344) :
Préparer un flacon de milieu de culture complet. Dans un flacon de 500ml de milieu ajouter un mélange d'antibiotiques réf.15140-122 (Gibco Invitrogen), à une concentration finale de Penicillin G Sodium de 60 unités par ml et Streptomycine de 60 µg par ml), 1,5% d'hydrolysat de lactalbumine à 10% (p/v) et 7% SVF.
Préparer une solution d'hydrolysat de lactalbumine à 10% (p/v) dans de l'eau ultra pure puis la filtrer sur filtre de 0,22µm. La solution est conservée à –20°C (+/-5°C) sous forme d'aliquotes.

Pour ZZ (GTEF) :
Préparer un flacon de milieu de culture complet. Dans un flacon stérile, mettre 10% de SVF, 45% de milieu IMDM + Glutamax réf 31980 (Gibco), et 45% DMEM/F-12 réf 31330 (Gibco).

Chaque milieu de culture complet nécessaire à l'ensemencement est préparé extemporanément.

8. ENTRETIEN DES LIGNEES CELLULAIRES

- Préchauffer le milieu de culture et la trypsine EDTA dans une enceinte thermostatiquee à + 37 °C (± 2 °C).
- Observer le tapis cellulaire au microscope (la confluence et l'aspect morphologique des cellules).
- Vider le surnageant de culture cellulaire.
- Rincer délicatement les tapis avec quelques mL de trypsine EDTA préchauffée en rejetant le milieu après chaque lavage (ce lavage est nécessaire pour éliminer les cellules mortes en suspension et le SVF, inhibiteur puissant de la trypsine) :
-
    - Pour BHK-21 : Rincer 1 fois avec environ 5 ml de trypsine EDTA pour un flacon de 75 cm^2 et mettre 2,5ml de trypsine puis incuber à 37°C. Attendre jusqu'à décollement du tapis cellulaire.

    - Pour VERO : Rincer 1 fois avec environ 2 ml de trypsine EDTA pour un flacon de 75 cm^2 et mettre 2,5ml de trypsine puis incuber à 37°C. Attendre jusqu'à décollement du tapis cellulaire.

    - Pour IB-RS-2 : Rincer 1 fois avec environ 5 ml de trypsine EDTA pour un flacon de 75 cm^2 et mettre 2,5ml de trypsine puis incuber à 37°C. Attendre jusqu'à décollement du tapis cellulaire.

    - Pour ZZ : Rincer 1 fois avec environ 5 ml de trypsine EDTA pour un flacon de 75 cm^2 et mettre 2,5ml de trypsine puis incuber à 37°C. Attendre jusqu'à décollement du tapis cellulaire.

- Préparer le milieu complet selon le nombre de boites. Après incubation des cellules, arrêter l'action de la trypsine en ajoutant un peu de milieu de culture complet (avec SVF) et dissocier complètement les cellules à la pipette par aspiration/refoulement et ajouter la suspension cellulaire au milieu complet préchauffé. Bien homogénéiser.
- Répartir les cellules dans de nouvelles boîtes de culture en tenant compte du taux de croissance de chaque type cellulaire (facultatif : après numération):

- Pour BHK : Une boite permet d'ensemencée 8 boites de T75 pour avoir une confluence complète au bout de 3 jours. Passage, 2 fois par semaine.

- Pour VERO : Une boite à confluence sera ensemencée dans 8 boites de culture cellulaire de même volume, 1 fois par semaine.

- Pour IB-RS-2 : Une boite de T75 permet d'ensemencée 8 boites de T75 pour avoir une confluence complète au bout de 3 jours. Passage, 2 fois par semaine.

- Pour ZZ : Une boite de T75 permet d'ensemencée 2 boites de T75 pour avoir une confluence complète au bout d'une semaine. Passage, une fois par semaine.

- Incuber à + 37 °C (± 1 °C) pendant le temps nécessaire jusqu' à confluence des cellules ou utilisation.

9. NUMERATION CELLULAIRE

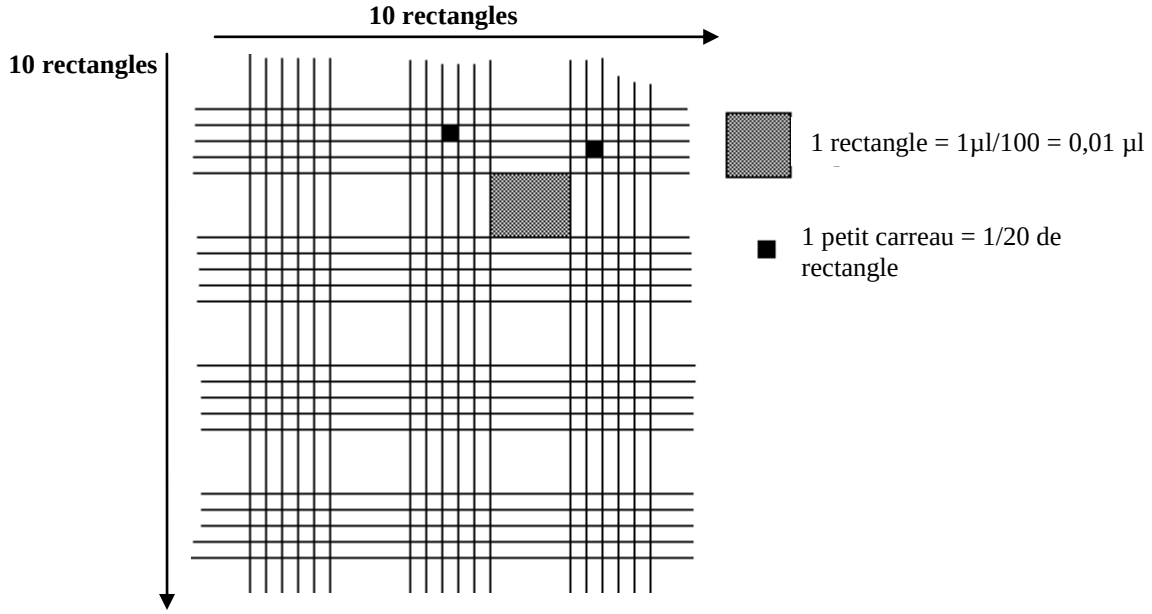
9.1. PRINCIPE

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de **cellules par millilitre**.
La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une cellule de comptage (par ex : cellule de Malassez ou autres cellules)

Présentation de la cellule de Malassez

La cellule de Malassez est constituée d'une lame et d'une lamelle permettant de définir un volume fixe.
Sur la lame sont gravés 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont subdivisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.
Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 mm^3 soit 1 µl

Schéma d'une portion de la lamelle



Réalisation du comptage

- Compter le nombre de cellules dans au moins 4 rectangles jusqu'à concurrence de 100 cellules environ.
- Pour les cellules qui chevauchent 2 rectangles, ne les compter qu'une fois : en pratique, compter les cellules qui chevauchent la ligne horizontale supérieure et la ligne verticale droite.
- faire la moyenne du nombre de cellules par rectangle

Par exemple
Si la moyenne du nombre de cellules par rectangle est de 8 cellules

→ Pour 100 rectangles, on multiplie par 100, ce qui donne **800 cellules**
Ceci correspond à 1 µl de suspension

Dans 1 ml, on a 800 cellules x1000

Si les cellules comptées sont dans un volume **de 10 ml**, la formule à appliquer pour connaître le nombre de cellules totales dans 10 ml est :

800x1000x10 = $8x10^6$ cellules dans les 10 ml

9.2. MODE OPERATOIRE

9.2.1. Assemblage de la cellule de Malassez

- Monter la cellule : humecter les bords prévus pour le montage et plaquer la lamelle dessus jusqu'à son immobilisation.

9.2.3. Dilution de la suspension cellulaire et comptage au bleu de trypan

- Le bleu trypan colore en bleu les cellules mortes, ce qui permet d'éviter de prendre en compte ces dernières lors de la numération
- Diluer la suspension cellulaire à une concentration compatible avec une numération cellulaire. Mélanger volume à volume une fraction de cette suspension avec la solution de bleu de trypan (0.04%)
- Compter les cellules vivantes (non colorées en bleu) au microscope droit.
- Tenir compte de la dilution dans le bleu de trypan lors du calcul final du nombre de cellules (multiplier par 2).

Par exemple
Si la moyenne du nombre de cellules par rectangle est de 5 cellules

→ Pour 100 rectangles, on multiplie par 100…ce qui donne **500 cellules**
Ceci correspond à 1 µl de suspension

Dans 1 ml, on a 500 cellules x1000

Si les cellules que l'on a comptées sont dans un volume **de 10 ml**, la formule à appliquer pour connaître le nombre de cellules totales dans 10 ml est :

500x1000x10 = $5x10^6$ cellules dans les 10 ml

En tenant compte de la dilution au ½ dans le bleu de trypan :

500x1000x10x2 = 10^7 cellules dans les 10 ml

9.2.4. Après le comptage :
- Séparer support et lamelle
- Nettoyer la cellule de Malassez avec de l'alcool à 70%

10. CONGELATION ET DECONGELATION DES CELLULES

10.1. PRINCIPE

La congélation des cellules à très basse température (en azote liquide, à -196°C) est un procédé qui permet de se constituer un stock de cellules et de le conserver pendant de nombreuses années sans perte des caractéristiques intrinsèques des cellules.

Lors du processus de congélation, les cellules sont placées dans un milieu adapté destiné à protéger leur viabilité lors de l'opération de refroidissement qui doit être progressif.

10.2. PREPARATION DU MILIEU DE CONGELATION

Deux types de milieux de congélation / protection peuvent être utilisés :
- soit 90 % SVF + 10 % DMSO
- soit 70 % milieu de culture + 20 % SVF + 10 % DMSO

Ce milieu doit être conservé sur glace pilée jusqu'à utilisation.

10.3. MODE OPERATOIRE

10.3.1. Congélation des cellules

Préparer des cryotubes en inscrivant clairement la nature des cellules congelées, le numéro de passage et la date de congélation. Conserver les tubes sur glace pilée jusqu'à utilisation.

Les cellules à congeler doivent avoir un minimum passage après décongélation et être en phase exponentielle de croissance. .

- Dissocier les cellules (procéder comme en 8 pour l'entretien des cellules)
- Effectuer une numération des cellules (procéder comme en 9)
- centrifuger 10 minutes à 1080xg, à + 20°C (± 5 °C)
- Suspendre les culots cellulaires dans le milieu de congélation en ajustant à la concentration de , , 10^7 cellules / ml pour une décongélation en flacon de 150 cm^2 et homogénéiser
- répartir la suspension dans des cryotubes à raison d'1 ml / tube et déposer ceux-ci dans une boite à congélation qui contient de l'isopropanol (permettant l'abaissement progressif de la température des cellules).
- Attention, les boîtes de congélation des cellules vides doivent être conservées à + 5 °C (± 3 °C) avant utilisation. Penser à changer l'isopropanol régulièrement (environ 5 cycles de congélation)
- placer la boite contenant les cryotubes à – 80 °C (+/-5 °C) pendant 24 à 48 h, puis transférer ceux-ci en azote liquide.

10.3.2. Décongélation des cellules

La décongélation, à l'inverse de la congélation doit être effectuée très rapidement pour respecter la viabilité des cellules.

- Préparer le flacon de milieu de culture cellulaire complet (voir paragraphe 8)
-
- Sortir l'ampoule de l'azote liquide
- La placer aussitôt au BM à + 37 °C (± 2 °C) pendant environ une minute, le temps de la décongélation de la suspension cellulaire.
- nettoyer l'extérieur de l'ampoule à l'alcool à 70°C de façon à minimiser les risques de contamination
- A l'aide d'une pipette, prélever son contenu et le déposer dans la boite de culture cellulaire
- Incuber la boite dans une enceinte thermostatique à + 37 °C (± 2 °C)
- Le milieu doit être changé après 24 heures de mise en culture afin d'éliminer l'agent cryoprotecteur qui, à + 37°C, est toxique pour les cultures cellulaires.
- Les cellules sont alors ensemencées comme en 8, lorsque les tapis sont confluents

11. CONTROLE DES CULTURES CELLULAIRES

Les types de contrôle effectués sont les suivants :

- contrôle de l'absence de mycoplasmes
- contrôle de l'absence de bactéries et de champignons
- contrôle de l'absence de virus
- contrôles de la sensibilité des cellules aux virus recherchés
- contrôle visuel de l'aspect des cellules

11.1. CONTROLE DE L'ABSENCE DE MYCOPLASMES :

Ce contrôle est effectué pour chaque nouvelle production d'un stock de cellules 1 ou 2 passages après la décongélation.

- Une boite de culture de 25 cm^2 est ensemencée pour obtenir un tapis confluent après une incubation de 24h à 37°C, dans 5 ml de milieu de culture complet mais sans antibiotique,.

- Après 24h d'incubation enlever 4 ml de milieu de culture. A l'aide d'un grattoir stérile, détacher le tapis cellulaire et récolter 500 µl de suspension cellulaire.
- Chauffer cet échantillon 15 min à 100 °C pour éliminer les traces de phosphatase alcaline puis le stocker à 4°C jusqu'à utilisation.

Le test de révélation est réalisé à l'aide kit Plasmo Test réf . rep-pt2 (InvivoGen) selon les instructions du fabriquant.

11.2. CONTROLE DE L'ABSENCE DE BACTERIES ET DE CHAMPIGNONS

Ce contrôle est effectué visuellement, avant le stockage des cellules en azote liquide et lors de chaque passage.
Le milieu de culture cellulaire ne doit pas être trouble, ni acide (indicateur coloré).

11.3. CONTROLE DE L'ABSENCE DE VIRUS

Ce contrôle est effectué visuellement, avant le stockage des cellules en azote liquide et lors de chaque passage par vérification de l'absence de virus manipulés dans le laboratoire et qui provoquent un effet cytopathogène (ECP).

(11.4. CONTROLE DE LA SENSIBILITE DES CELLULES AUX VIRUS RECHERCHES)

Afin d'obtenir des résultats reproductibles, il est recommandé d'utiliser les lignées sur un nombre limité de passages aprés décongélation.
Des essais antérieurs réalisés au laboratoire ont permis de préciser le nombre de passages que pouvaient subir les cellules IBRS2 après décongélation sans perte de sensibilité vis à vis du virus de la FA et de la MVP : ce nombre de repiquages est possible jusqu'à 14 passages au moins.
De même pour les cellules BHK-21, le nombre de passage après décongélation sans perte de sensibilité vis-à-vis du virus de la FCO est de 8 à 12. Après 8 passages, les BHK-21 peuvent changer d'aspect morphologique : le tapis est alors constitué de cellules ayant une allure moins fibroblastique, et de cellules rondes, (vacuolisées, détachées du support).
Procéder à une nouvelle décongélation de cellules stockées dans l'azote lorsque les cellules en cours atteignent le nombre de passages où elles risquent de perdre leur sensibilité vis-à-vis du virus recherché..
Après chaque décongélation, un test de sensibilité est effectué par titrage d'une souche virale prétitrée aux passages 2 ou 3 après décongélation. Le titre obtenu doit se situer dans une fourchette de ±0.5 log du titre attendu.

11.5. CONTROLE VISUEL DE L'ASPECT DES CELLULES

Contrôle de l'absence d'arrondissement des cellules, vacuolisation, rétractation, détachement du support.
Ce contrôle est effectué avant le stockage des cellules en azote liquide et lors de chaque passage.

MODE OPERATOIRE

Extraction des ARNs génomiques viraux avec les colonnes QIAamp Viral RNA (QIAGEN)

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce test est utilisé pour le diagnostic virologique lors de suspicion clinique, pour une surveillance sanitaire ou pour un certificat d'exportation.
Ce mode opératoire est dérivé des Notices d'Utilisation incluses dans la trousse commerciale QIAamp Viral kit (QIAGEN ; référence : 52906) du fabricant Qiagen (QIAGEN S.A., 3 avenue du Canada, LP 809, 91 974 Courtaboeuf Cedex, rue Maryse Bastié, Ker Lann, CS17219, 35172 Bruz cedex, France) (voir notice NTF.VIRO.66).

2. REFERENCES NORMATIVES

Aucune.

3. DEFINITIONS

matrice : sang total, prélevé sur anticoagulant EDTA, broyat clarifié de tissu, sérum, liquide vésiculeux, surnageant de cultures de cellules, fécès.

4. PRINCIPE DE LA METHODE

L'Extraction des ARNs totaux des échantillons se fait au moyen de réactifs commercialisés par la société Qiagen (kit QIAamp Viral RNA kit).
Les ARNs viraux sont obtenus par lyse de l'échantillon avec le tampon de lyse AVL. L'ajout d'éthanol à ce tampon de lyse conditionne la liaison des acides nucléiques (ARNs totaux) à la silice des colonnes de Qiagen. L'ARN carrier permet d'améliorer la liaison des acides nucléiques (principalement lorsque ceux-ci sont en faibles quantités) à la silice des colonnes. Les inhibiteurs de PCR (sels, métabolites) sont ensuite éliminés par lavages, en présence des tampons AW1 et AW2 additionnés d'éthanol. Les acides nucléiques sont ensuite élués et sont prêts pour servir de matrice pour la RT-PCR.

5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Centrifugeuse de paillasse
- Microcentrifugeuse de paillasse
- Vortex
- Matériels de pipetage et de micropipetage
- Pot en verre (Canadiens)
- Pointes à filtres RNAse et DNAse free de 10, 20, 200 et 1000µl
- Microtubes de 1,5 ml et de 2 ml RNAse et DNAse free
- Tubes de 50 ml stériles

6. REACTIFS ET PRODUITS

6.1. CONTENU DE LA TROUSSE COMMERCIALE :

- tampon de lyse AVL
- tampon AVE
- tampon de lavage AW1
- tampon de lavage AW2
- H2O, RNase-free
- ARN Carrier (poly A lyophilisé)
- QIAamp Mini Spin Columns
- microtubes (2 ml)
- Manuel d'utilisation du kit QIAamp Mini Spin Columns

6.2. REACTIFS NECESSAIRES NON FOURNIS PAR LE KIT :

- Ethanol qualité biologie moléculaire (96-100%)
- Milieu MEM (réf :GIBCO, 31095-052)

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les prélèvements biologiques analysés seront :

- des sangs . Le sang doit avoir été impérativement prélevé dans un tube anticoagulant EDTA.
- des broyats clarifiés de tissus

Dès réception, les sangs et tissus sont conservés à + 5°C (± 3 °C) si utilisation dans les 72h ou stockés à -80°C (± 3 °C) jusqu'à utilisation.
Le sang, le sérum et le surnageant de cultures cellulaires sont utilisés directement sans traitement préalable.
Les tissus sont broyés dans du milieu de culture ou dans du PBS pH7.2 à raison de 5g ou 10g pour 100ml. Le broyat est clarifié par centrifugation à 350g pendant 10mn à + 5 °C (± 3 °C).
Dans le cas où une préparation particulière doit être appliquée suivre le mode opératoire correspondant. Pour la recherche du virus de la fièvre aphteuse suivre le mode opératoire MO-Viro-07.

Recommandations :

- Respecter les recommandations classiques données pour éviter les contaminations lors du traitement du prélèvement (mise en aliquote des prélèvements ; utilisation de pointes à filtres ; port de gant…).
- Travailler avec du consommable stérile RNase free.
- Ajouter des témoins négatifs d'extraction pour s'assurer de l'absence de contamination inter-échantillons. On prendra un volume de MEM identique à la prise de volume préconisé pour l'échantillon (140µl), et ces témoins négatifs d'extraction seront par la suite traités comme des échantillons. Prévoir au moins 1 témoin négatif d'extraction par série de 15 échantillons.

8. MODE OPERATOIRE

8.1. EXTRACTION DES ARNS TOTAUX

8.1.1 Avant l'extraction :

Les réactifs du kit QIAamp Viral kit sont à conserver et à utiliser à température ambiante (15 - 25°C). Seul les tampons RNA-AVE seront conserver à – 25°C (± 5°C).

Reconstituer les tampons de lavage en ajoutant 125 ml d'éthanol dans le flacon AW1 et 160 ml d'éthanol dans le flacon AW2, tel que recommandé par le fabricant du kit QIAamp Viral RNA.

Préparation du tampon RNA-AVE :
Ajouter 310µl de tampon AVE dans un tube d'ARN carrier du kit (5 tubes par kit de 250 réactions). Vortexer par à-coups et centrifuger brièvement. Le tampon RNA-AVE peut être conservé à – 25°C (± 5°C) entre chaque série d'extraction. Ne pas décongeler ce tampon plus de 3 fois.

8.1.2. Préparation des échantillons biologiques et des témoins négatifs d'extraction

Sous un poste de sécurité microbiologique :
- prélever 140 µl de chaque sang ou de broyat de tissu clarifié et les déposer dans un microtube de 2 ml
- pour les témoins négatifs d'extraction, 140 µl de MEM sont prélevés et déposés dans un microtube de 2 ml (prévoir 1 témoin négatif pour 15 échantillons). Les témoins négatifs seront identifiés avec un numéro composé du mois et du jour où l'extraction à lieu, suivi de leur ordre de réalisation dans cette journée (exemple : deux témoins eau pour une extraction manuelle de 28 échantillons réalisées le 23 février auront pour numéro : 0223.1 et 0223.2).

8.1.2. Préparation du tampon de lyse (TL) :

Si au moment de l'extraction, le tampon AVL fourni par le kit d'extraction n'est pas homogène (présence de cristaux), il est préconisé de chauffer le tampon AVL avant utilisation (5 min à 80°C).
Pour 27 échantillons de sang :
- prélever 16,8 ml de tampon AVL (16,8 ml = 30 (27 prélèvements + 2 témoins négatifs + 1) x 0.56 ml de tampon AVL) et les mettre dans un 'canadien'
- y ajouter 168 µl de tampon RNA-AVE (30 x 5,6 µl de tampon RNA-AVE)
- vortexer le tube et centrifuger brièvement.

Si le nombre d'échantillons à extraire est compris entre 1 et 24, se reporter au tableau ci-dessous pour les volumes de tampon AVL et de tampon RNA-AVE à prélever pour réaliser le TL :

No. samples	Vol. Buffer AVL (ml)	Vol. carrier RNA–AVE (µl)	No. samples	Vol. Buffer AVL (ml)	Vol. carrier RNA–AVE (µl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.40	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

8.1.3. Lyse :

- ajouter 560 µl du tampon TL dans chaque microtube contenant les 100µl de sang ou de MEM (témoin négatif d'extraction)
- vortexer par à-coups pendant 15 s. Vérifier si le mélange est bien homogène
- incuber pendant 10 min à température ambiante
- centrifuger les tubes brièvement
- ajouter 560 µl d'éthanol
- vortexer les tubes pendant 15 s par à-coups
- centrifuger les tubes brièvement. On obtient un lysat du prélèvement.

8.1.4. Chargement de la colonne :

- prélever 630 µl de lysat et les déposer soigneusement dans une colonne du kit placée sur un tube de collection du kit. Boucher la colonne
- centrifuger pendant 1 min à 6000 g (Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante)
- jeter le tube de collection, remettre la colonne sur un nouveau tube de collection du kit et y déverser soigneusement le reste du lysat de l'échantillon
- centrifuger pendant 1 min à 6000 g
- jeter le tube de collection, remettre la colonne sur un nouveau tube de collection du kit.

8.1.5. Lavage :

- déboucher la colonne et ajouter 500 µl du tampon AW1 (tampon de lavage du kit).
- boucher la colonne et centrifuger pendant 1 min à 6000 g
- jeter le tube de collection, remettre la colonne sur un nouveau tube de collection et y ajouter 500 µl du tampon AW2 (tampon de lavage du kit)
- centrifuger pendant 3 min à 20 000 g
- jeter le tube de collection, remettre la colonne sur un microtube de 2 ml (non fourni par le kit)
- centrifuger la colonne pendant 1 min à 14000 g. (Élimination de traces du tampon AW2).

8.1.6. Elution :

- placer la colonne dans un microtube de 1,5 ml (non fourni par le kit)
- mettre 40 µl du tampon AVE (tampon d'élution du kit)
- boucher la colonne et incuber pendant 1-2 min à température ambiante
- centrifuger pendant 2 min à 6000 g
- jeter les colonnes, boucher les tubes contenant les ARNs élués.

Renseigner la feuille de suivi analytique.

Garder à + 5°C (± 3 °C) les ARNs élués s'ils sont utilisés dans les 24 heures ou congeler à -80°C (± 3 °C) ou -20°C (± 3 °C). **s'ils sont utilisés postérieurement.**

MODE OPERATOIRE

Recherche des anticorps spécifiques des protéines non structurales du virus de la fièvre aphteuse par ELISA PrioCHECK®FMDV-NS

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce test est utilisé en première intention lors du suivi sérologique des cheptels bovins, ovins, porcins et caprins après un épisode de fièvre aphteuse (FA) ayant entraîné une vaccination d'urgence, afin de prouver l'absence de circulation du virus, étape nécessaire pour le recouvrement du statut de zone indemne. Les animaux vaccinés et infectés vont développer, suite à une multiplication transitoire du virus, des anticorps contre les protéines non structurales (NSP) du virus (notamment la protéine 3ABC) à la différence des animaux vaccinés mais non infectés, qui ne reconnaissent que les protéines constitutives (structurales) de la particule virale.
Ce mode opératoire est dérivé de la Notice d'Utilisation, Version 1.0_f (en français), incluse dans la trousse commerciale du fabricant PRIONICS Lelystad B.V. (P.O. Box 2271, 8203 AG Lelystad, Pays-Bas). Le test détecte les animaux infectés par le virus de la fièvre aphteuse, indépendamment du sérotype responsable de l'infection ou du statut vaccinal de l'animal. Il peut être utilisé pour tester le bétail, les moutons, les chèvres et les porcs.

2. REFERENCES

Méthode d'analyse préconisée par l'Office International des Epizooties (OIE) dans le chapitre 2.1.5. du Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres publié en 2008.
Méthode d'analyse officiellement reconnue par le Laboratoire Communautaire de Référence pour la fièvre aphteuse (Institute for Animal Health, Pirbright, Royaume-Uni).

Notice du fabriquant : Version 1.0_f

Reference bibliographique : Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigen expressed in baculovirus. *K.J.Sorensen, K.G.Madsen, E.S.Madsen, J.S.Salt, J.Nqindi and D.K.J.Mackay, Arch Virol(1998) 143: 1461-1476*

3. DEFINITIONS

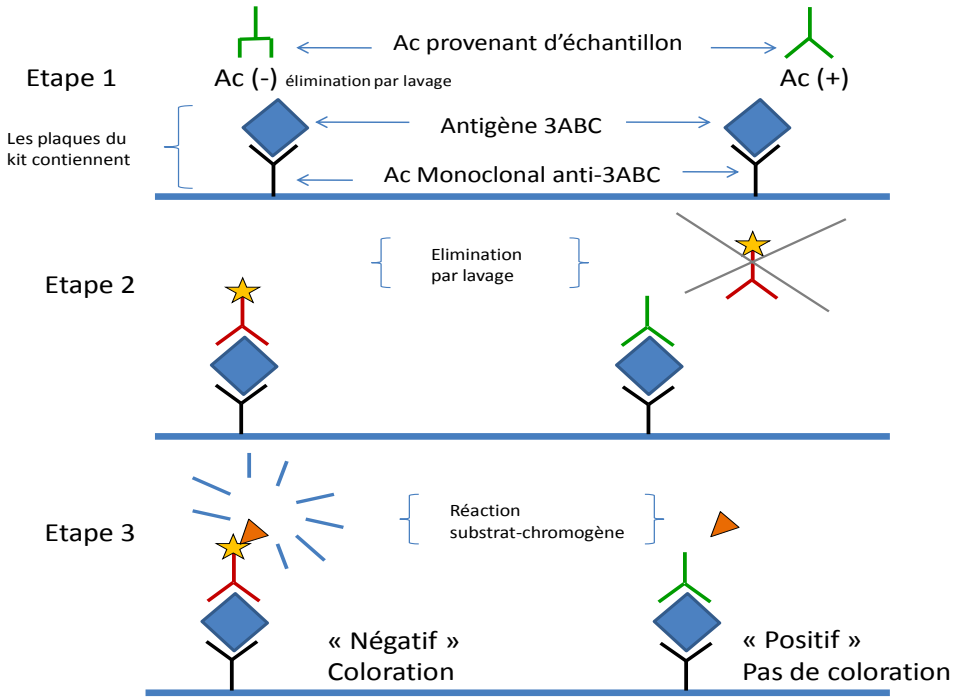
matrice : sérum d'animaux bovins, ovins, porcins et caprins
analyte : anticorps spécifiques des protéines non structurales 3ABC du virus de la fièvre aphteuse (tous sérotypes)

ELISA : Enzyme- linked immunosorbent assay
DO : Densité optique
TMB: tétraméthylbenzidine

4. PRINCIPE DE LA METHODE

Le test PrioCHECK® FMDV NS pour la détection des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines non structurales du virus de la FA est un ELISA bloquant en phase solide.
Les cupules des microplaques ELISA ont été sensibilisées avec un anticorps monoclonal (AcM) spécifique de la protéine 3ABC puis incubées avec l'antigène 3ABC recombinant. En conséquence, les plaques ELISA fournies dans la trousse commerciale présentent la protéine 3ABC qui a été capturée par l'anticorps monoclonal, fixé au fond des puits.
Le test est réalisé en ajoutant d'abord l'échantillon à tester, puis, après lavage, le conjugué, un anticorps AcM anti-3ABC couplé à l'enzyme peroxydase (HRPO). Les anticorps spécifiques dirigés contre la protéine 3ABC qui seraient présents dans l'échantillon bloquent donc l'attachement du conjugué à l'antigène capturé.
Après incubation puis lavage, le chromogène substrat (TMB) de la HRPO est ajouté. L'apparition de couleur traduit l'attachement du conjugué à l'antigène capturé, donc l'absence d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine 3ABC. Le développement de la coloration est stoppé et la DO est mesurée à 450nm. Au contraire, si l'attachement du conjugué à l'antigène capturé est bloqué par la présence d'anticorps spécifiques dans l'échantillon à tester, le conjugué non attaché aura été éliminé au lavage et la couleur apparaîtra peu ou pas, traduisant la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre la 3ABC dans l'échantillon.

Schéma de principe :



5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- micropipettes, monocanales et multicanales, adaptées aux différents volumes à prélever
- pointes , adaptées aux micropipettes utilisées
- spectrophotomètre (lecteur ELISA avec filtre 450nm)
- agitateur à microplaques (facultatif)
- laveur de microplaques (facultatif)

6. REACTIFS ET PRODUITS

6.1. CONTENU DE LA TROUSSE COMMERCIALE

- 5 plaques 96-puits de test (ou des barrettes correspondant à 5 plaques 96-puits) conditionnées sous vide partiel et contenant un sachet de déshydratant (composant 1)
- 1 flacon de 2.5ml de conjugué concentré 30x (*composant 2*)
- 1 flacon de 60ml de tampon de dilution concentré 2x (*composant 3*). Conservation du tampon dilué 1x: 24h à 5°C +/- 3°C
- 5 flacons d'additif concentré, lyophilisé (*composant 4*) (à reconstituer dans 2,5ml d'eau déminéralisé du kit, conservation après reconstitution à -20°C jusqu'à la date de péremption)
- 1 flacon de 10ml d'eau déminéralisée (*composant 5*)
- 1 flacon de 60ml de liquide de lavage concentré (200x) (*composant 6*), Conservation du tampon dilué 1x: 1 semaine à 22°C +/- 3°C
- 1 flacon de 0.6ml de *composant 7* (contrôle positif) prêt à l'emploi
- 1 flacon de 0.6ml de *composant 8* (contrôle positif faible), prêt à l'emploi
- 1 flacon de 0.6ml de *composant 9* (contrôle négatif), prêt à l'emploi
- 1 flacon de 60ml de solution de chromogène substrat (TMB), prêt à l'emploi (*composant 10*)
- 1 flacon de 60ml de solution d'arrêt, prêt à l'emploi (*composant 11*)
- 10 films adhésifs pour sceller les plaques (*plate sealers*)
- Notice d'utilisation
- Certificat d'analyse

6.2. CONDITIONS DE CONSERVATION

A réception et jusqu'à ouverture, la trousse commerciale PrioCHECK® FMDV-NS doit être entreposée à + 5 °C (± 3 °C) en respectant la date limite d'utilisation (*expiry date*) qui figure sur l'étiquette du coffret.
Après ouverture, tous les éléments de la trousse doivent être entreposés à + 5 °C (± 3 °C), sauf l'additif (composant 4) reconstitué qui doit être aliquoté et conservé à - 20 °C +/-5°C

6.3. PRECAUTIONS

- Lire avec précision et suivre toutes les instructions du kit.
- Les recommandations nationales concernant la manipulation d'échantillons animaux doivent être appliquées de manière stricte. Le test PrioCHECK FMDV NS ne doit être utilisé que dans les laboratoires équipés pour cela, car les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et tout matériel en contact avec ces échantillons doit être considéré comme potentiellement contaminé.
- Pour obtenir des résultats optimums avec le test PrioCHECK FMDV NS les précautions suivantes doivent être prises ;
  - le mode d'emploi doit être rigoureusement suivi
  - le test doit être réalisé avec de l'eau déminéralisée ou avec de l'eau équivalente
- Les informations présentées sur l'étiquette du flacon contenant le chromogène substrat doivent être lues attentivement.
- Attention, la solution d'arrêt est acide. Eviter tout contact avec la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter rapidement un médecin.
- Tous les réactifs doivent être équilibrés à la température ambiante du laboratoire (22°C +/-3C) avant utilisation.
- Ne pas mélanger les différents composants du kit, ni les feuillets d'instruction, d'un n° de lot à l'autre.
- Ne pas dépasser la date limite de validité.
- A l'ouverture d'un nouveau kit vérifier le n° de version de la notice d'utilisation si elle est toujours la même que celle référencées dans ce mode opératoire, la signer, la dater et l'archiver. Si la version a

changé repérer les modifications par rapport à l'ancienne version et les souligner. Informer le correspondante qualité pour mettre à jour le mode opératoire.

- Chaque opérateur ne doit pas tester plus de deux microplaques au maximum à la fois.

6.4. SOLUTIONS A PREPARER A L'AVANCE

6.4.1. Liquide de lavage

Le liquide de lavage concentré doit être dilué dans de l'eau déminéralisée ou de l'eau de qualité équivalente (Aqua B. Braun, réf. 3610531, Braun Medical.A.S) (non fournie dans la trousse). Pour 1 plaque de test (6 puits de référence + 90 échantillons), préparer 500 ml de liquide de lavage concentré 1X (2,5 ml de liquide de lavage concentré + 497,5 ml d'eau).

6.4.2. Tampon de dilution et tampon ELISA

Reconstituer extemporanément un flacon d'additif (lyophilisé)

- équilibrer les flacons des réactifs lyophilisés à température ambiante du laboratoire (22°C +/- 3 °C)
- tapoter délicatement le flacon sur le plan de travail pour collecter le contenu au fond du flacon
- ouvrir le flacon
- ajouter 2,5 ml d'eau déminéralisée (fournie dans la trousse)
- laisser le lyophilisat se dissoudre
- refermer le flacon et agiter délicatement pour dissoudre le reste du lyophilisat
- laisser reposer pendant 15 minutes à température ambiante du laboratoire (22°C +/- 3 °C)
- de temps en temps au cours de ces 15 minutes, retourner délicatement, plusieurs fois, le flacon pour homogénéiser le contenu (éviter la formation de mousse)
- diluer le tampon de dilution concentré au 1/2 dans de l'eau déminéralisée ou ultra-pure (Aqua B. Braun, réf. 3610531, Braun Medical.A.S). Pour une plaque, préparer 24 ml en mélangeant 12 ml de tampon de dilution concentré à 12 ml d'eau.
- ajouter ensuite 10% (V/V) d'additif reconstitué pour obtenir le tampon ELISA (soit, pour une plaque, 21,6 ml de tampon de dilution et 2,4 ml d'additif). Le tampon ELISA en excès peut être conservé à + 5 °C (± 3 °C) pendant 24h.

6.4.3. Préparation du conjugué

La dilution de travail doit être préparée extemporanément dans le tampon ELISA. Pour une plaque , préparer 12ml de conjugué (ajouter 400µl de conjugué 30x à 11,6ml de tampon ELISA).

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Avant et après utilisation, les échantillons de sérum doivent être conservés soit à 5°C+/- 3°C (pour une courte période, maximum un mois), soit à – 20 °C +/- 5°C,(pour une long période, plus d'un mois).

8. MODE OPERATOIRE

JOUR 1

8.1. ETAPE DE REPARTITION DES SERUMS

- Répartir 80 µl de tampon ELISA dans toutes les cupules
- *Répartir les références (pour chaque plaque test)*
  - ☞ ajouter 20 µl du contrôle négatif (*composant 9*) dans les cupules A1 et B1

- ☞ ajouter 20 µl du contrôle positif faible (*composant 8*) dans les cupules C1et D1
- ☞ ajouter 20 µl du contrôle positif fort (*composant 7*) dans les cupules E1 et F1

- *Répartir les sérums à tester*
  - ☞ pour chaque sérum à tester, ajouter 20 µl d'échantillon pur dans la cupule correspondante (plan de plaque en fonction du nombre d'échantillon à tester)

8.2. INCUBATION

- couvrir la plaque test avec un film adhésif pour sceller les plaques
- agiter doucement la plaque
- incuber pendant une nuit (16-18h) à 22°C +/- 3 °C.

JOUR 2

8.3. INCUBATION AVEC LE CONJUGUE

- vider la plaque test et laver 6 fois avec 200 à 300 µl de liquide de lavage par cupule. Après le dernier lavage, tapoter fermement la plaque test sur du papier absorbant
- distribuer 100 µl de solution de travail du conjugué dans toutes les cupules utilisées
- couvrir la plaque test avec un film adhésif pour sceller les plaques
- incuber pendant 60min +/- 5min à 22°C +/- 3 °C

8.3. INCUBATION AVEC LE SUBSTRAT CHROMOGENE

- vider la plaque test et laver 6 fois avec 200 à 300 µl de liquide de lavage par cupule. Après le dernier lavage, tapoter fermement la plaque test sur du papier absorbant
- ajouter 100 µl de solution de substrat chromogène (TMB) dans toutes les cupules utilisées
- incuber pendant 20 minutes à 22°C +/- 3°C
- ajouter 100 µl de solution d'arrêt (composant 11) dans toutes les cupules utilisées en respectant le même ordre et le même rythme que pour la distribution du substrat chromogène
- homogénéiser le contenu des plaques avant de mesurer la densité optique (DO) à 450 nm sur un spectrophomètre (lecteur ELISA) dans les 15 minutes après l'ajout de la solution d'arrêt

9. EXPRESSION DES RESULTATS

9.1. CALCULS

- calculer la moyenne des valeurs de DO des cupules A1 et B1 : contrôle négatif = DO_{max}
- calculer le pourcentage d'inhibition (%inh) pour les différents contrôles et pour les échantillons au moyen de la formule suivante :

$$\% \text{ inh} = 100 - \left(\frac{DO_{\text{contrôle ou échantillon}}}{DO_{max}} \times 100 \right)$$

9.2. VALIDATION DU TEST

Le test est validé si et seulement tous les critères suivants sont réunis :
- la valeur de DO_{max} doit être supérieure à 1,000 **(> 1,000)**
- le contrôle positif faible doit donner un pourcentage d'inhibition supérieur à 50% **(> 50 %)**
- le contrôle positif doit donner un pourcentage d'inhibition supérieur à 70% **(> 70 %)**

Si un de ces critères n'est pas rempli, les résultats sont ininterprétables et les échantillons doivent être re-testés.

Si la DO d'un échantillon est supérieure à la DOmax, le pourcentage d'inhibition peut être considéré comme étant égal à 0%. Si la moyenne des DO pour le contrôle négatif est inférieure à 1,000, il est possible que la solution de chromogène soit trop froide à l'utilisation. Dans ce cas, pré-incuber la solution à 22°C +/- 3°C pendant 30 min avant distribution ou incuber les plaques avec le chromogène plus long temps (sans dépasser 30min)
Si la moyenne des DO du contrôle négatif est supérieure à 2, une incubation plus courte avec le chromogène est recommandée.

Les contrôles du kit sont insérés conformément aux recommandations du fournisseur. De même la validation du test est déterminée conformément à la notice. Aucune règle sur l'écart acceptable entre les deux valeurs d'un contrôle n'est définie par le fournisseur, la validité du test est basée sur la moyenne des deux valeurs.

9.3. EXPRESSION DES RESULTATS

- **% inh ≥ 50** : **échantillon positif** (présence d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine 3ABC du virus de la fièvre aphteuse)
- **% inh < 50** : **échantillon négatif** (absence d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine 3ABC du virus de la fièvre aphteuse)

Vu l'importance de la maladie et le CV de répétabilité (CV intra-plaque compris entre 3,12% et 4,94%), le résultat d'un échantillon dont le % Inh est compris entre 45% et 55% ne sera considéré valide que si son statut ne varie pas si le calcul du %Inh est réalisé avec chaque valeur de DOmax et non avec la valeur moyenne.
Vu l'incertitude estimée de la méthode (~12%), l'importance de la maladie et le rôle du LNR, en fonction du contexte pour lequel l'analyse est réalisée, le responsable du LNR ou son adjoint peuvent décider de réaliser des tests complémentaires sur des sérums positifs ou négatifs pour confirmer le résultat observé.

MODE OPERATOIRE

Recherche des antigènes du virus de la fièvre aphteuse par ELISA de capture (sandwich) indirect

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce test est utilisé en première intention lors de suspicion clinique de fièvre aphteuse. Il permet de détecter les antigènes du virus de la fièvre aphteuse dans un échantillon de lésion, et d'identifier le sérotype du virus aphteux incriminé. Il s'agit de l'épreuve prescrite par l'Office International des Epizooties (OIE), par l'Union Européenne et par la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture.
Si la suspicion concerne des animaux de l'espèce porcine, ce test inclut également le virus de la maladie vésiculeuse du porc afin de poser d'emblée un diagnostic différentiel.

2. REFERENCES NORMATIVES

Méthode d'analyse officielle de l'OIE décrite dans le chapitre 2.1.5. du Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres publié en 2008
Méthode d'analyse officielle de l'Union Européenne décrite dans la Décision 91/189/CEE.

3. DEFINITIONS

matrice : Broyat clarifié de lésions vésiculeuses, liquide de lésions vésiculeuses, ou sang total.
analyte : antigènes totaux du virus de la fièvre aphteuse.

Abréviations :
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
DO : densité optique
OPD : orthophenylenediamine

4. PRINCIPE DE LA METHODE

Il s'agit d'un ELISA de capture, c'est-à-dire que les antigènes du virus de la fièvre aphteuse, éventuellement présents dans l'échantillon à analyser, sont « capturés » au moyen d'anticorps spécifiques. Ce test permet de différencier en même temps les 7 sérotypes possibles du virus de la fièvre aphteuse (O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 et Asia).
Il repose sur l'utilisation de 7 couples de sérums hyper-immuns obtenus sur lapin et cobaye, contenant donc des anticorps spécifiques dirigés contre chacun des sérotypes de virus de la fièvre aphteuse.
Les cupules des plaques ELISA ont été saturées par adsorption avec les anticorps spécifiques présents dans des sérums hyper-immuns de lapin.

Le test est réalisé en ajoutant successivement l'échantillon à tester, un sérum hyper-immun de cobaye, le conjugué (un sérum de lapin dirigé contre les anticorps de cobaye) couplé à l'enzyme peroxydase (HRPO) et le chromogène substrat de la HRPO Chaque étape inclut une incubation et des lavages.
L'apparition de couleur traduit l'attachement du conjugué aux anticorps de cobaye, donc la présence de l'antigène capturé. La recherche spécifique des 7 sérotypes en parallèle permet donc de compléter le diagnostic en déterminant le sérotype incriminé.

Le même principe est utilisé pour la recherche du virus de la maladie vésiculeuse du porc, en utilisant un couple spécifique de sérums hyper-immuns obtenus sur lapin et cobaye.

5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- poste de sécurité microbiologique (PSM) de classe II : l'emploi de virus vivant de la FA, agent de catégorie E3, impose de travailler en laboratoire confiné de catégorie 3
- enceintes réfrigérées : -20°C (+/- 5°C°) et + 5 °C (± 3 °C)
- enceinte thermostatique à + 37 °C (± 2 °C)
- micropipettes monocanales et multicanales, adaptées aux différents volumes à prélever
- pointes sans filtre ayant été stérilisées, adaptées aux micropipettes utilisées
- microplaques 96-puits., stériles, à fond plat, pour ELISA Maxisorp réf 735-0199 (NUNC)
- films adhésifs pour sceller les microplaques
- agitateur de microplaques
- réservoirs plastiques (gouttières)
- spectrophotomètre (lecteur ELISA)
- pH mètre ou papier pH
- balance (+/- 0,1 g)
- petit matériel courant de laboratoire (stérile) : erlenmeyers avec bouchons, béchers, éprouvettes graduées, barreaux magnétiques, tubes avec bouchons, tubes eppendorfs, cryotubes, pipettes …
- vortex
- agitateur magnétique
- minuteur

6. REACTIFS ET PRODUITS

6.1. PRODUITS CHIMIQUES

- capsules de carbonate-bicarbonate pH 9,6 réf. : C3041(Sigma)
- PBS réf. : 18912-014 (Gibco-Invitrogen)
- Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate) réf. P1379 (Sigma)
- lait en poudre écrémé réf. : 170-6404 (Bio-Rad)
- tablettes d'OPD réf. : P9187 (Sigma)
- glycérol réf. G-7893 (Sigma)
- acide sulfurique concentré réf. 320501-1L (Sigma)
- eau distillée ou des-ionisée au minimum

6.2. REACTIFS BIOLOGIQUES

6.2.1. Sérums utilisés pour saturer les plaques (pour capturer l'antigène)

- sérums hyper-immuns préparés sur lapins, dirigés contre chacun des 7 sérotypes de virus aphteux (et le virus de la maladie vésiculeuse du porc)

Ces sérums sont obtenus auprès du laboratoire de référence de l'OIE et de l'Union Européenne (IAH Pirbright).
Ils sont réparties par aliquotes et conservés à – 20°C (+/-5°C) jusqu'à utilisation.
La dilution finale d'utilisation réalisée en tampon PBS a été déterminé suite à une étude, pour chaque lot .

6.2.2. Sérums utilisés pour détecter l'antigène capturé

- sérums hyper-immuns préparés sur cobayes, dirigés contre chacun des 7 sérotypes de virus aphteux (et le virus de la maladie vésiculeuse du porc)

Ces sérums sont également obtenus auprès du laboratoire de référence de l'OIE et de l'Union Européenne (IAH Pirbright).
Chaque sérum hyper-immun de cobaye est mélangé préalablement à volume égale avec du sérum de bovin naïf réf. : 16170-086 (Invitrogen), et incubé pendant 30 min au bain-marie à + 56 °C (± 1 °C, Le mélange est répartis par aliquotes et conservés à – 20°C (+/- 5°C) jusqu'à utilisation.
La dilution finale d'utilisation réalisée en tampon PBS-Tween20 (0,05%)-lait (5% p/v) a été déterminée suite à une étude, pour chaque lot. Les aliquotes étant déjà dilués au ½, il faut en tenir compte pour la dilution finale.

6.2.3. Autres sérums

- sérum de bovin naïf, (afin d'éviter les réactions non spécifiques) réparti par aliquotes et conservé à -20°C (+/- 5°C). Réf. 16170-086 ou 16170-078 (Invitrogen)
- sérum de lapin anti-cobaye (dirigé contre les immunoglobulines de cobaye), conjugué à la peroxydase réf. : P0141 (DAKO) est dilué au 1/1000 ème, donnée par le fournisseur.
- Sérum de Goat Anti-Rabbit (dirigé contre les immunoglobulines de lapin), conjugué à la péroxydase réf. : P0448 (DAKO) est dilué au 1/5000, pour vérifier que les plaques ont été sensibilisées de façon satisfaisante.

La dilution finale d'utilisation réalisée en tampon PBS-Tween20 (0,05%)-lait (5% p/v) est donnée par le fournisseur

6.2.4. Les antigènes

Les antigènes de contrôle, inactivés, appartiennent aux 7 sérotypes de virus aphteux et au virus de la maladie vésiculeuse du porc. Ils sont obtenus auprès du laboratoire de référence de l'OIE et de l'Union Européenne (IAH Pirbright) ou de la société Mérial. Ce sont des surnageants de cultures cellulaires infectées qui ont été inactivés puis lyophilisés.
Chaque antigène inactivé est préalablement remis en suspension dans de l'eau distillée stérile selon les indications du fournisseur. Il est alors réparti par aliquotes et conservés en azote liquide ou – 80°C+/- 5°C).
Ces antigènes inactivés ont été pré-titrés en ELISA pour garantir leur utilisation aux dilutions directes d'utilisation suivantes : 1/5 ; 1/25 et 1/125. La dilution au 1/5 doit correspondre à la DO maximale (haut de la portion linéaire de la courbe de titrage DO environ 2). Celle au 1/25 doit correspondre à une DO intermédiaire, et celle au 1/125, à une DO faible.
Au moment de l'utilisation les dilutions sont réalisées dans du tampon PBS-Tween20 (0,05%) directement dans la plaque ELISA (voir paragraphe 8.2.).

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS

La préparation des échantillons de lésions est décrite dans la procédure traitement des échantillons.

8. MODE OPERATOIRE

8.1. ETAPE DE SENSIBILISATION DES PLAQUES AVEC LES SERUMS PREPARES SUR LAPINS

- diluer les différents sérums de lapin, anti-sérotype O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 et MVP
- distribuer 50 µl de chaque sérum dilué dans toutes les cupules d'une rangée d'une plaque ELISA, en respectant le plan de plaque suivant : sérums anti-sérotype O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 et MVP dans les rangées A à H respectivement
- tapoter les plaques pour assurer une bonne répartition des sérums dans les puits
- couvrir les plaques avec des films adhésifs pour microplaques et numéroter les plaques
- placer les plaques en position stationnaire une nuit à + 5°C (± 3 °C) ou une heure à 37°C (± 2 °C) sous agitation (100 – 120 révolutions / minute)
- après l'incubation, vider le contenu des plaques si elles sont utilisées immédiatement.
-

> *Remarque : les plaques non vidées peuvent être recouvertes d'un film adhésif et conservées à – 20 °C (+/- 5 °C) pendant plusieurs mois (leur sensibilité doit être contrôlée au moins une fois tous les 6 mois). Ainsi, en cas de suspicion, les plaques déjà sensibilisées sont simplement sorties du congélateur et utilisées comme suit.*

- laver les plaques 5 fois, avec du tampon PBS à raison de 250 µl par puits

8.2. ETAPE DE DISTRIBUTION DES ANTIGENES CONTROLES ET DES ECHANTILLONS A ANALYSER

- Distribuer 50 µl de tampon PBS-Tween20 (0,05%) dans les cupules des colonnes 1, 2 ,3 qui serviront à la dilution des antigènes positifs de contrôle, et 50 µl de PBS-Tween20 dans les cupules des colonnes 4, 8, 12 qui correspondront aux témoins antigènes négatifs. déposer les antigènes contrôles et faire les dilutions de 1/5 en 1/5 (voir paragraphe 6.1.4.), en respectant le plan de plaque. Par exemple, pour l'antigène du sérotype O :
  - ✓ déposer 12,5 µL d'antigène O dans la cupule A1
  - ✓ mélanger l'antigène et le diluant dans la cupule A1 et transférer 12,5 µl du mélange dans la cupule A2
  - ✓ mélanger l'antigène et le diluant dans la cupule A2 et transférer 12,5 µl du mélange dans la cupule A3
  - ✓ mélanger l'antigène et le diluant dans la cupule A3 et rejeter 12,5 µl du mélange
- répéter cette opération pour tous les antigènes contrôles
- déposer les échantillons à analyser : chaque échantillon est déposé à raison de 50 µL par cupule dans toutes les cupules de trois colonnes (réalisation de triplicats). Le premier échantillon est déposé dans les cupules des colonnes 5, 6 et 7, le second dans les cupules des colonnes 9, 10 et 11
-

> *Remarque : si plus de 2 échantillons sont à tester, utiliser autant de plaques sensibilisées que nécessaire. Dans ce cas, les antigènes contrôles ne sont déposés que sur la première plaque.*

- couvrir les plaques avec des films adhésifs pour microplaques
- placer les plaques une heure à 37°C (± 2 °C) sous agitation (100 – 120 révolutions / minute)
- après l'incubation, sortir les plaques et enlever les films adhésifs
- vider les plaques et procéder à 7 lavages successifs avec du tampon PBS-Tween (o,o5%) à raison de 250µl par puits.

8.3. ETAPE DE DISTRIBUTION DES SERUMS PREPARES SUR COBAYES

- diluer les différents sérums de cobaye, anti-sérotype O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 et MVP
- distribuer 50 µl de chaque sérum dilué dans toutes les cupules d'une rangée d'une plaque ELISA, en respectant le plan de plaque : ainsi, les sérums anti-sérotype O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 et MVP sont distribués dans les rangées A à H respectivement
- tapoter les plaques pour assurer une bonne répartition des sérums dans les puits
- couvrir les plaques avec des films adhésifs pour microplaques
- placer les plaques une heure à 37°C (±2 °C) sous agitation (100 – 120 révolutions / minute)
- après l'incubation, sortir les plaques et enlever les films adhésifs
- vider les plaques et procéder à 7 lavages successifs comme décrit en 8.2.

8.4. ETAPE DU CONJUGUE

- diluer le sérum conjugué selon le nombre d'échantillon, prévoir deux colonnes pour vérification de la sensibilisation (voir paragraphe 6.2.3.)
- distribuer 50 µl dans toutes les cupules de la plaque ELISA
- tapoter les plaques pour assurer une bonne répartition des sérums dans les puits
- couvrir les plaques avec des films adhésifs pour microplaques
- placer les plaques une heure à 37°C (±2 °C) sous agitation (100 – 120 révolutions / minute)
- après l'incubation, sortir les plaques et enlever les films adhésifs
- vider les plaques et procéder à 7 lavages successifs comme décrit en 8.2.

8.5. ETAPE DU CHROMOGENE SUBSTRAT

- préparer **extemporanément** la solution d'OPD selon les indications du fournisseur (, dans un tube maintenu à l'abri de la lumière (papier d'aluminium). **Attention ce produit est cancérigène et doit être manipulé avec précaution et nécessite le port de gants.**
- après les lavages, distribuer 100 µL de la solution d'OPD dans chaque cupule
- couvrir les plaques avec une feuille d'aluminium pour les maintenir à l'obscurité et à température ambiante.
- Après 15 minutes d'incubation, arrêter la réaction en ajoutant 100 µL d'acide sulfurique 1,25 M dans chaque cupule
- mesurer la DO à 490 nm

9. EXPRESSION DES RESULTATS

9.1. CALCULS

Pour chaque rangée (détection d'un sérotype spécifique) :

- les valeurs brutes de DO des trois cupules des antigènes contrôles sont utilisées séparément (ex pour le sérotype O : A1, A2 et A3) = $DO_{fort/sérotype}$, $DO_{moyen/sérotype}$ et $DO_{faible/sérotype}$
- calculer la moyenne des valeurs brutes de DO des triplicats de chaque échantillon (ex pour le premier échantillon vis à vis du sérotype O : moyenne des DO des cupules A5, A6 et A7) = $DO_{échantillon/sérotype}$
- calculer la moyenne des valeurs brutes de DO des témoins antigènes négatifs (moyenne des DO des cupules 4, 8 et 12) = $DO_{min/sérotype}$
- calculer les valeurs corrigées de DO pour les antigènes contrôles et pour les échantillons en retirant la valeur $DO_{min/sérotype}$ à la valeur brute de DO (lue pour antigènes ou moyenne pour échantillons).

Il est possible d'utiliser une feuille de calcul Excel paramétrée pour effectuer le calcul automatique après avoir copié-collé ou ressaisi les valeurs brutes de DO obtenues.

9.2. VALIDATION DU TEST

Pour chaque sérotype spécifique, le test est validé si :

Les valeurs corrigées de DO des antigènes contrôles forts et moyens (dilution 1/5 et 1/25) sont toutes supérieures à 0,1 **(≥ 0,1)**

Si ce critère n'est pas rempli, les échantillons doivent être testés à nouveau.

9.3. EXPRESSION DES RESULTATS

Pour un échantillon :

- **valeur corrigée de $DO_{échantillon/sérotype}$ > 0,1** : échantillon positif pour le virus du sérotype concerné
- **valeur corrigée de $DO_{échantillon/sérotype}$ < 0,1** : échantillon négatif pour le virus du sérotype concerné
- **une valeur corrigée de $DO_{échantillon/sérotype}$ proche de 0,1** : le résultat doit être confirmé par d'autres techniques d'analyse directe réalisées en même temps, ou par un nouveau test ELISA de capture soit directement sur l'échantillon initial, soit après amplification sur culture cellulaire

MODE OPERATOIRE

Recherche du virus de la fièvre aphteuse
par isolement viral sur cultures cellulaires

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce test est utilisé en première intention lors de suspicion clinique de fièvre aphteuse. Il s'agit de l'épreuve prescrite par l'Office International des Epizooties (OIE), par l'Union Européenne et par la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture.

2. REFERENCES NORMATIVES

Méthode d'analyse officielle de l'Office International des Epizooties (OIE), décrite dans le chapitre 2.1.1. du Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres, 5ème édition, 2004 (version anglaise, adoptée en mai 2006 et revue le 15 janvier 2007).

3. DEFINITIONS

matrice : voir MO.VIRO.07
analyte : virus infectieux de la fièvre aphteuse

Abréviations :
ECP : effet cytopathogène
SVF : sérum de veau fœtal

4. PRINCIPE DE LA METHODE

Le test repose sur la détection, in vitro, du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par la mise en évidence d'un effet cytopathogène (ECP) après inoculation de cellules sensibles.
Lors de suspicion clinique de fièvre aphteuse dans l'espèce porcine, un diagnostic différentiel avec la maladie vésiculeuse du porc est réalisé d'emblée en utilisant 2 ou 3 types différents de cellules.

Si un ECP se développe, le surnageant de culture est collecté lorsque l'ECP est complet (MO.VIRO.07). Des tests complémentaires sont alors réalisés.

5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- poste de sécurité microbiologique (PSM) de classe II : l'emploi de virus vivant de la FA, agent de catégorie E3, impose de travailler en laboratoire confiné de catégorie 3
- enceintes réfrigérées : - 20 °C et + 5 °C (± 3 °C)
- enceintes thermostatées : à + 37 °C (± 1 °C), à + 35 °C (± 1 °C)
- centrifugeuse réfrigérée (optionnel)
- bain marie à + 37 °C (± 1 °C) (optionnel)
- microscope inversé
- microplaques 24-puits, stériles, à fond plat
- films adhésifs pour sceller les microplaques
- agitateur de microplaques
- laveur de microplaques (facultatif)
- réservoirs plastiques (gouttières)
- pH mètre ou papier pH
- balance (+/- 0,1 g)
- petit matériel courant de laboratoire (stérile) : erlenmeyers avec bouchons, béchers, éprouvettes graduées, barreaux magnétiques, tubes avec bouchons, tubes eppendorfs, cryotubes, pipettes …
- boîtes, tubes ou microplaques pour culture cellulaire
- micropipettes, monocanales et multicanales, adaptées aux différents volumes à prélever
- pointes sans filtre ayant été stérilisées, adaptées aux micropipettes utilisées
- vortex
- minuteur

6. REACTIFS ET PRODUITS

6.1. LISTE

- cellules sensibles : lignées cellulaires IB-RS-2 (cellules de rein de porc), ZZ (GTEF : cellules de langue de chèvre) et éventuellement BHK-21 (cellules de rein de hamster). Cultures cellulaires sont réalisées en tubes ou en plaque 24-puits, et à utiliser à 80 – 100 % de confluence.

  Remarque : au contraire des cellules IB-RS-2, les ZZ ne sont pas sensibles au virus de la maladie vésiculeuse du porc.

-
- milieu de culture MEM (Eagle's Minimum Essential Medium)
- eau distillée ou dé-ionisée
- mélange d'antibiotiques de chez Gibco (Invitrogen) cat N° 15140-122 : constitution du mélange = Penicillin G Sodium à 10 000 unités par ml et Streptomycine à 10 000µg par ml
- acide lactique (10%) ou citrique (0,2%) (solutions désinfectantes) ou Anios SPS 2000 (Solution commerciale)

6.2. PREPARATION

6.2.1. Préparation du milieu de culture complet

Il s'agit d'un milieu de culture cellulaire additionné d'antibiotiques utilisé pour la préparation des échantillons et le recouvrement des tapis cellulaires après inoculation virale.

- Préparer du milieu MEM avec 2% du mélange d'antibiotique et 2,5% HEPES (facultif)
- répartir ce milieu dans plusieurs flacons :

- ✓ Un flacon destiné à l'inoculation des cellules
- ✓ Un flacon destiné à la préparation du broyat
- ✓ Un flacon en réserve

- maintenir les flacons de milieu à température ambiante (15 – 25 °C) jusqu'à leur utilisation

6.2.2. Préparation des solutions désinfectantes

- Anios SPS 2000
- conserver à température ambiante (15 – 25 °C)

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS

La préparation des échantillons est décrite dans le mode opératoire MO.VIRO.07.

8. MODE OPERATOIRE

8.1. INOCULATION ET INCUBATION

- Utiliser les plaques P24 de cultures cellulaires prêt à inoculer, en IBRS-2, en ZZ, ou en BHK (si nécessire) :
- Dans une plaque P24, inoculer une colonne de 4 puits avec l'échantillon pur et 4 puits avec l'échantillon dilué au ½ . Prévoir un 4 puits témoin cellules pour chaque type cellulaire ou l'on rajoute du milieu MEM 2% d'antibiotique, 2,5% HEPES (facultatif)
- **Une plaque P24 correspond à 1 échantillon**. Soit 1 échantillon est fait en double (IBRS-2 et ZZ).
- identifier les puits avec la référence de l'échantillon, la date et le numéro de passage sur cellules (1ère ou 2ème inoculation)
- vider le milieu de culture cellulaire présent dans les tubes
- laver une fois les cellules avec du milieu de culture complet préparé en 6.2.1., maintenu à température ambiante (15 – 25 °C) ou préchauffé à + 37 °C (± 1 °C)
- vider le milieu de rinçage
- inoculer les autres tubes avec 0,1 ml de l'échantillon à analyser
- placer les plaques pendant 1 heure à 37°C (phase d'adsorption du virus)
- Récupérer l'inoculum, puis mettre à -80°C +/-5°C
- couvrir les tapis cellulaires avec 0,5 ml de milieu de culture cellulaire MEM 2% d'antibiotique, 2,5% HEPES (facultatif)
- désinfecter l'extérieur des plaques avec un essuie-tout imbibé d'un peu de solution désinfectante
- placer les plaques à l'étuve à 37°C sous atmosphère CO_2 et humide (± 1 °C), pendant 48 h.

8.2. OBSERVATION DES TAPIS CELLULAIRES

Pendant 2 jours, observer régulièrement (matin, midi, soir) les tapis cellulaires au microscope inversé et surveiller l'apparition d'un éventuel ECP.

8.2.1. Si un ECP apparaît

- récupérer le surnageant de la culture cellulaire infectée selon le mode opératoire MO.VIRO.07
- poursuivre l'identification et la caractérisation

8.3.2. Si aucun ECP n'apparaît dans les 48 heures

Pour chaque type cellulaire, il faut effectuer un second passage en aveugle.

Pour cela :
- récupérer le surnageant de la culture cellulaire infectée comme en 8.2.1.
- inoculer à nouveau des P24 de culture cellulaire homologue, comme en 8.1.
- pendant 2 jours, observer les tapis cellulaires inoculés et surveiller l'apparition d'un ECP
- si un ECP apparaît, faire comme en 8.2.1.
- si aucun ECP n'apparaît après ce second passage, l'échantillon est négatif

9. EXPRESSION DES RESULTATS

9.1. LECTURE

- principe : la lecture est réalisée à l'œil
- afin d'éviter les contaminations croisées, aucun témoin positif n'est utilisé.

9.2. EXPRESSION DES RESULTATS

Pour chaque type cellulaire :
- si observation d'un ECP au 1er ou 2ème passage : **isolement viral positif**
- si pas d'observation d'un ECP après 2 passages en aveugle : **isolement viral négatif**

MODE OPERATOIRE

Recherche du virus de la fièvre aphteuse
par détection du génome viral par RT-PCR en temps réel
en une étape et en duplex

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce test est utilisé (i) pour le diagnostic virologique de la fièvre aphteuse, lors d'une suspicion clinique, en complément de l'isolement viral sur culture cellulaire, (ii) pour une surveillance sanitaire ou (iii) pour permettre la délivrance d'un certificat d'exportation.

2. REFERENCES NORMATIVES

Références bibliographiques :

1. *M. Reid, N. Ferris, G. Hutchings, Z. Zhang, G. Belsham and S. Alexandersen.* Detection of all seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by real-time, fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods, 2002, 105 : 67-80*

2. *T. Rasmussen, A. Uttenthal, K. de Stricker, S. Belak and T. Storgaard*. Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol., 2003, 148 : 2005-2021*

3. *J.F. Toussaint, C. Sailleau, E. Bréard, S. Zientara and K. De Clercq.* Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCR targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods, 2007, 140 : 115-128*

4. *N.P. Ferris, D.P. King, S.M. Reid, G.H. Hutchings, A.E. Shaw, D.J. Paton, N. Goris, B. Haas, B. Hoffmann, E. Brocchi, M. Bugnetti, A. Dekker and K. De Clercq.* Foot-and-mouth disease virus: a first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol., 2006, 117 : 130-140*

5*. Johnny D Callaham; Fred Brown; Fernando A. Osorio; Jung H.Sur; Ed Kramer; Gary W. Long; Juan Lubroth; S.J. Ellis, K.S. Shoulars, K.L. Gaffney, D.L. Rock, W.M. Nelson.* Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *YAVMA, 2002, 220, 11:1636-42.*

6*. N.Goris, F. Vandenbussche, C. Herr, J. Villiers, Y. Van der Stede, K. De Klercq.* Validation of two real-time RT-PCR methods for Foot-and-mouth disease diagnosis : RNA-extraction, matrix effect, uncertainty of measurement and precision. *J. of Virol. Met, 2009, 160, 157-162.*

3. DEFINITIONS

spectre : toutes les espèces sensibles
matrice : lait, sérum ou plasma, surnageant de broyat d'épithélium issu de lésions (vésicules) après centrifugation, prélèvements oropharyngés, sang total, broyat d'organes, suspension virale issue de culture cellulaire infectée, ARN extrait
analyte : ARN génomique du virus de la fièvre aphteuse (tout sérotype)
RT : transcription inverse
PCR : amplification en chaîne par polymérisation

4. PRINCIPE DE LA METHODE

Après extraction des ARN, le test repose, dans un premier temps, sur la transcription inverse (RT) de l'ARN du virus de la fièvre aphteuse en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc obtenu est, dans un second temps, amplifié

par PCR par une ADN polymerase qui utilise des amorces et une sonde TaqMan®, marquée en 5' par un fluorochrome FAM ou VIC. Les deux réactions enzymatiques sont réalisées, successivement, dans un même tube (one-step RT-qPCR).
En raison du taux élevé de mutations générées lors de la réplication des virus à ARN, il est recommandé d'utiliser simultanément les 2 couples d'amorces spécifiques disponibles ciblant deux régions différentes dans le génome de la FA : la région de l'IRES, et la région codant pour l'ARN polymérase ARN dépendante 3D.
En outre, un troisième couple d'amorces est utilisé pour détecter le gène de la β-actine cellulaire endogène (présent dans la fraction d'ARN cellulaire extraite avec les ARN viraux). La détection de ce gène constitue un contrôle externe des étapes d'extraction et d'amplification.
Cette réaction est effectuée en duplex. Dans une seule réaction de one-step RT-qPCR deux cibles sont détectées simultanément : soit IRES + β-actine, soit 3D + β-actine. Dans cette réaction la sonde pour la cible de la FA est marquée par un florochrome FAM et la sonde de la cible β-actine est marquée par un fluorochrome VIC.

5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- Poste de Sécurité Microbiologique de classe II : l'emploi de virus vivant de la FA, agent de classe 3, impose de travailler en laboratoire confiné de catégorie 3.
- Bac réfrigérant
- Glace pilée
- Microcentrifugeuse de paillasse
- Agitateur vibrant
- Matériels de pipetage et de micro pipetage
- Pointes à filtres RNAse et DNAse free de 10, 20, 200 et 1000µL
- Microtubes de 0,2 mL, 1,5 mL et de 2 mL RNAse et DNAse free
- Consommable plastique (microplaques, microtubes, barrettes….) compatible avec l'appareil thermocycleur en temps réel : par ex MicroAmp® Optical 8-Tube Strip, 0.2 mL (réf 4316567, Applied Biosystems) ou MicroAmp® Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL (réf. 4358293, Applied Biosystems)et MicroAmp® Optical 8-Cap Strip (réf. 4316567 Applied Biostystems)
- Aluminium
- Thermocycleur en temps réel (ABI Prism 7300 n°bal 6686133, One Step Plus n° bal 6686173)

6. REACTIFS ET PRODUITS

6.1. TROUSSE DE RT-PCR ET DE PCR

- AgPath-ID™One-Step RT-PCR Reagents 500mx réf. 4387424 (Applied Biosystems)
- H_2O ultrapure DEPC RNAse/DNAse free (Invitrogen réf. 46-2224) pour les solutions d'amorces et sondes ou bien H_2O ultrapure provenant du kit AgPath-ID™One-Step RT-PCR Reagents 500mx réf. 4387424.

6.2. AMORCES ET SONDES

- Tous les stocks mères sont à 100µM, aliquotés et conservés à -20°C
- Les stocks de travail des amorces sont à 10µM (sauf celui de l'amorce antisens IRES qui est à 100µM), aliquotés et conservés à -20°C
- Les stocks de travail des sondes sont à 10µM (3D) ou 5µM (IRES et β-actine), aliquotés et conservés à -20°C

  Lors de l'achat d'un nouveau lot d'amorces ou de sondes, les solutions des nouveaux lots préparées sont vérifiées par la réalisation d'une rtRT-PCR sur le contrôle interne en parallèle avec l'ancien lot.

amorces/sonde (fournies par Applied Biosystem ou MWG)	Séquence (5'- 3')	Location	Réf.
FA-IR-219-246F sens	**5'- CAC YTY AAG RTG ACA YTG RTA CTG GTA C -3'**	nt 515-542	1
FA-IR-315-293R reverse	**5'- CAG ATY CCR AGT GWC ICI TGT TA -3'**	complémentaire à nt 611-589	1
FA- IR-292-269P sonde	**FAM 5'- CCT CGG GGT ACC TGA AGG GCA TCC -3' TAMRA**	complémentaire à nt 588-555	1
FA-3D-F sens	**5'- ACT GGG TTT TAC AAA CCT GTG A -3'**	nt 7485-7506	5
FA-3D-R reverse	**5'- GCG AGT CCT GCC ACG GA -3'**	complémentaire à nt 7591-7575	5
FA-3D-P sonde	**FAM 5'- TCC TTT GCA CGC CGT GGG AC -3' TAMRA**	nt 7536-7555	5
ACT-F sens	**5'- CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C -3'**	nt 1005-1029	3
ACT- R reverse	**5'- CG GAC TCA TCG TAC TCC TG CTT -3'**	complémentaire à nt 1135-1114	3
ACT P sonde	**VIC 5'- TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T -3' TAMRA**	1081-1105	3

Avec Y = C ou T W = A ou T R = A ou G I = inosine

Note : la numérotation des nucléotides (nt) de l'ARN viral se réfère à la publication de *Forss S et al, NAR, 1984, 12 : 6587-6601* sur le séquençage de la souche O1K,.accession number GenBank: X00871.1. La numérotation des nucléotides (nt) du gène de la β actine se réfère à la publication de *Toussaint, et al. J. Virol. Methods, 2007.*

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Extraire l'ARN viral à partir de 250 µL de suspension, comme indiqué dans le mode opératoire correspondant à l'extraction de l'ARN viral, à l'aide du TRIZOL et le reprendre dans 10µL d'eau RNAse free (MO.VIRO.11). Il est possible d'utiliser les kits d'extraction QIAGEN, à partir de 140 µL de suspension, en reprenant l'ARN dans 100µL d'eau RNAse free (par ex. Invitogen, réf. 46-2224) (MO.VIRO.27).
- Pour chaque série de 1 à 10 échantillons réaliser l'extraction à partir d'un échantillon négatif correspondant à la même matrice que les échantillons à tester. En absence d'échantillon négatif faire l'extraction à partir d'une culture de cellule BHK-21 ou IBRS2 ou ZZ.

Recommandations :

- Respecter les recommandations classiques données, pour éviter les contaminations (aliquoter les prélèvements ; aliquoter les réactifs ; séparer les postes de travail ; utiliser de pointes à filtres ; porter des gants et les changer en tant que de besoin).
- Travailler avec du consommable stérile, à usage unique et RNase free.
- Ajouter des témoins négatifs d'extraction pour s'assurer de l'absence de contamination inter-échantillons en réalisant un témoin à partir d'un échantillon négatif (= témoin négatif)
- Réaliser un témoin en remplaçant l'échantillon par de l'eau ultra pure. (= Contrôle Blanc)
- Ces témoins négatifs d'extraction seront par la suite traités, comme des échantillons.
- Il est recommandé d'utiliser un témoin négatif et un contrôle blanc, tous les 8 à 10 échantillons testés

Contrôle Interne Positif et Négatif (β -actine positif):

Le contrôle interne idéal est un épithélium issu d'animaux infectés par le virus. Ce contrôle est utilisé comme un échantillon. A défaut d'avoir un épithélium positif, on peut contaminer une suspension d'épithélium négatif par du virus. Ces contrôles sont mis en aliquotes et conservés à -80°C.

En absence d'épithélium, le contrôle interne positif est effectué à partir de l'ARN extrait d'une suspension virale correspondant à chaque sérotype (O, A, Asia1). L'ARN positif repris dans de l'eau RNAse/DNAse free (Invitrogen ref.6-2224) additionnée du RNA carrier (Invitrogen ref. R8508) est aliquoté et conservé à -80°C.

Le contrôle interne négatif est effectué à partir de l'ARN extrait d'une suspension de cellules, repris dans de l'eau RNAse/DNAse free (Invitrogen ref.6-2224) additionnée du RNA carrier (Invitrogen ref. R8508) puis mis en aliquotes et conservé à -80°C. La dilution du contrôle utilisée est déterminée lors de l'établissement du contrôle et de la carte de contrôle de telle sorte qu'elle permet d'obtenir un Ct 2 à 3 fois inférieur au seuil de positivité. Pour le duplex, le contrôle Interne positif est préparé en mélangeant 1:1 (v/v) contrôle interne positif et contrôle négatif. 5µl de cette préparation est utilisé pour chaque cible en duplex. En parallèle, 5µl du contrôle négatif (β-actine positif) est utilisé pour chaque cible.

8. MODE OPERATOIRE

8.1 PREPARATION DE MIX

- Préparation du mix RT-PCR : Préparer le mix pour toutes les réactions à réaliser (prévoir 1 ou 2 réactions supplémentaires), pour un volume final de 25 µL par réaction, contenant, pour chaque gène ciblé (IRES et β-actine, 3D et β-actine), les réactifs suivants :

Réactif	Mix détection de la FA			
	(FA IRES-β-actine) Par Réaction		**(FA 3D-β-actine)** Par Réaction	
	Concentration finale	Volume (µl)	Concentration finale	Volume (µl)
Eau Ultrapure (DNase RNase Free)		1,350		1,400
Tampon 2X	1x	12,500	1x	12,500
Amorce sens FA (IRES et 3D 10µM)	0,4 µM	1,000	0,4 µM	1,000
Amorce antisens FA (IRES **100µM**) et (3D 10µM)	(SP*)1,2 µM	0,300	0,4 µM	1,000
Sonde (FAM-TAMRA) (IRES 5µM) et (3D 10µM)	0,25 µM	1,250	0,2 µM	0,500
Amorce sens B-actine 10µM	0.4µM	1,000	0.4µM	1,000
Amorce antisens B-actine 10µM	0.4µM	1,000	0.4µM	1,000
Sonde (VIC-TAMRA) (B-actine) 5µM	0.12µM	0,600	0.12µM	0,600
RT-PCR mix 25X (Enzyme)	1x	1,000	1x	1,000
Total à distribuer par puits (µL)	20,00		20,00	
Volume ARN à distribuer par puits	5µl		5µl	

*stock primaire à 100µM

- Répartir 20µL d'ARN dans chaque tube et ajouter 5µL d'ARN extrait
- Fermer les tubes avec les barrettes « optical caps ou sceller les microplaques avec un film optique». Vérifier la fermeture avec la roulette et centrifuger le tout, juste pour faire descendre, le contenu de chacun, à l'aide d'une microcentrifugeuse.

8.2 PROGRAMMATION DE L'APPAREIL PCR EN TEMPS REEL

De préférence programmer le thermocycleur avant la réalisation du mix RT-PCR, sinon conserver la plaque ou les tubes sur de la glace en fusion ou à + 5°C (± 3 °C), à l'abri de la lumière jusqu'à ce que le thermocycleur soit programmé. Démarrer le « run » rapidement, après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le thermocycleur.
Toutes les cibles sont lues en FAM ou VIC. Le Quencher (Tamra) est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive ROX pour les appareils ABI. La lecture de la fluorescence s'effectue à la fin de l'étape d'élongation qui est d'une minute à 60°C.

Etapes	Température	Temps	qt
Réverse transcription	45°C	10min	1x
Inactivation de la RT	95°C	10min	1x
Dénaturation	95°C	15s	45x
Hybridation, Elongation et lecture	60°C	1min	

9. EXPRESSION DES RESULTATS

9.1. LECTURE

La lecture de la fluorescence s'effectue, à chaque cycle, à la fin de l'étape d'élongation qui est d'une minute à 60°C. Le cycle seuil « CT » (Cycle Threshold) est défini comme le numéro du cycle pour lequel l'intensité de fluorescence coupe la ligne de base ou « threshold ». Cette ligne de base est fixée manuellement ou automatiquement (par le logiciel de l'appareil).

9.2. VALIDATION DU TEST

L'essai est validé si :
- les NTC et les témoins négatifs d'extraction ont tous une valeur de CT indéterminée (UNDET)
- la valeur du Ct du contrôle interne positif répond aux critères de validation comme définis dans la procédure P. A. VIRO VIII.01.

Le résultat de chaque échantillon est validé si :
- le CT obtenu pour l'échantillon avec la RT-PCR de la β -actine est inférieur à 40 *Si le CT est égal ou supérieur à 40, ou encore indéterminé (UNDET), diluer les ARNs totaux non dénaturés au 1/5e dans de l'eau RNAse-DNAse free et recommencer les RT-PCR FA et β-actine, à partir de cette dilution.*
- *Si le CT de la β B-actine est de nouveau égal ou supérieur à 40, ou encore indéterminé, recommencer l'extraction des ARNs totaux, en diluant l'échantillon au 1/2 dans du PBS pH7.4 (sans calcium, ni magnésium).*
- *Si le CT est de nouveau égal ou supérieur à 40, ou indéterminé, l'échantillon sera considéré comme inexploitable (présence d'inhibiteurs de RT-PCR ; échantillon lysé ou putréfié…).*

Remarque *:* Il est possible que certains échantillons soient pauvres en cellules par ex. le plasma ou suspension virale issue de culture cellulaire infectée et les valeurs de CT pour le gène du β-actine seraient toujours supérieurs à 40 ou indéterminés.

9.4. EXPRESSION DES RESULTATS

- L'échantillon est considéré négatif lorsque le CT obtenu avec la PCR FA est > **45**. Le résultat est rendu comme **« génome du virus de la fièvre aphteuse, non détecté »**.
- l'échantillon est considéré positif lorsque le CT obtenu avec la PCR FA est inférieur ou égal à **38**. Le résultat est rendu comme **« mise en évidence du génome du virus de la fièvre aphteuse ».**
- l'échantillon est considéré comme douteux, lorsque le CT obtenu avec la PCR FA est compris entre **38** et **45**. Le test doit être renouvelé pour définir le statut de l'échantillon par rapport à l'infection.

MODE OPERATOIRE

Caractérisation du virus de la fièvre aphteuse par RT-PCR en temps réel en une étape et en duplex (Sérotypage type O, A, Asia1 et SAT2)

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce test pourrait être utilisé (i) pour le diagnostic virologique de la fièvre aphteuse, associé à la RT-qPCR de détection de la FA (3D et IRES), lors d'une suspicion clinique, en complément de l'isolement viral sur culture cellulaire, (ii) pour une surveillance sanitaire ou (iii) pour permettre la délivrance d'un certificat d'exportation.

2. REFERENCES NORMATIVES

Références bibliographiques :

1- Shaw AE, Reid SM, Ebert K, Hutchings GH, Ferris NP, King DP***.*** Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. J Virol Methods. 2007 Jul;143(1):81-5

2- S. M Reid, N. J Knowles, M. H. N.Shirazi, D. P King*. Detection of FMDV serotypes O, A and Asia1 by real-time RT-PCR. EuFMD 2008 Meeting. The global control of FMD – Tools, ideas and ideals – Erice, Italy 14-17 October 2008*

3. *J.F. Toussaint, C. Sailleau, E. Bréard, S. Zientara and K. De Clercq.* Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCR targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods, 2007, 140 : 115-128*

4*. N.Goris, F. Vandenbussche, C. Herr, J. Villiers, Y. Van der Stede, K. De Klercq.* Validation of two real-time RT-PCR methods for Foot-and-mouth disease diagnosis : RNA-extraction, matrix effect, uncertainty of measurement and precision. *J. of Virol. Met, 2009, 160, 157-162.*

3. DEFINITIONS

spectre : toutes les espèces sensibles
matrice : lait, sérum ou plasma, surnageant de broyat d'épithélium issu de lésions (vésicules) après centrifugation, prélèvements oropharyngés, sang total, broyat d'organes, suspension virale issue de culture cellulaire infectée, ARN extrait
analyte : ARN génomique du virus de la fièvre aphteuse (tout sérotype)
RT : transcription inverse
PCR : amplification en chaîne par polymérisation

4. PRINCIPE DE LA METHODE

Après extraction des ARN, le test repose, dans un premier temps, sur la transcription inverse (RT) de l'ARN du virus de la fièvre aphteuse en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc obtenu est, dans un second temps, amplifié par PCR par une ADN polymerase qui utilise des amorces et une sonde TaqMan®, marquée en 5' par un fluorochrome FAM ou VIC. Les deux réactions enzymatiques sont réalisées, successivement, dans un même tube (one-step RT-qPCR).
Pour caractériser le sérotype de la FA les amorces et sondes spécifiques ont étaient désignées (voir réf. 2) dans la région VP1 codant pour une protéine de capside. Ces couples d'amorces et sondes détectent exclusivement type O, type A, type Asia1, ou type SAT2. De plus, un autre couple d'amorces est utilisé pour détecter le gène de la β-actine cellulaire endogène (présent dans la fraction d'ARN cellulaire extraite avec les ARN viraux). La détection de ce gène constitue un contrôle externe des étapes d'extraction et d'amplification. Cette réaction est effectuée en duplex. Dans une seule réaction de one-step RT-qPCR deux cibles sont détectées simultanément :

cible de sérotypage (soit type O, soit type A, soit type Asia1, soit type SAT2) ensemble avec de la β-actine. Dans cette réaction la sonde pour la cible de sérotypage est marquée par un fluorochrome FAM et la cible de la β-actine est marquée par un fluorochrome VIC.

5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- Poste de Sécurité Microbiologique de classe II : l'emploi de virus vivant de la FA, agent de classe 3, impose de travailler en laboratoire confiné de catégorie 3.
- Bac réfrigérant
- Glace pilée
- Microcentrifugeuse de paillasse
- Agitateur vibrant
- Matériels de pipetage et de micro pipetage
- Pointes à filtres RNAse et DNAse free de 10, 20, 200 et 1000µL
- Microtubes de 0,2 mL, 1,5 mL et de 2 mL RNAse et DNAse free
- Consommable plastique (microplaques, microtubes, barrettes….) compatible avec l'appareil thermocycleur en temps réel : par ex MicroAmp® Optical 8-Tube Strip, 0.2 mL (réf 4316567, Applied Biosystems) ou MicroAmp® Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL (réf. 4358293, Applied Biosystems)et MicroAmp® Optical 8-Cap Strip (réf. 4316567 Applied Biostystems)
- Aluminium
- Thermocycleur en temps réel (ex : ABI Prism 7300 n°bal 6686133, One Step Plus n° bal 6686173)

6. REACTIFS ET PRODUITS

6.1. TROUSSE DE RT-PCR ET DE PCR

- AgPath-ID™One-Step RT-PCR Reagents 500rnx réf. 4387424 (Applied Biosystems)
- H_2O ultrapure DEPC RNAse/DNAse free (Invitrogen réf. 46-2224) pour les solutions d'amorces er sondes ou bien H_2O ultrapure provenant du kit AgPath-ID™One-Step RT-PCR Reagents

6.2. AMORCES ET SONDES

- Les amorces et sondes sont fournies par MWC ou Applied Biosystem
- Tous les stocks mères sont à 100µM, aliquotés et conservés à -20°C
- Les stocks de travail des amorces de sérotypage sont à 20µM, aliquotés et conservés à -20°C
- Les stocks de travail des amorces de β-actine sont à 10µM, aliquotés et conservés à -20°C
- Les stocks de travail des sondes sont à 10µM (SAT2), à 11,25µM (O, A, Asia1) (mettre 11,2µl à 100µM + 88,8 µl Eau Ultra Pure) ou à 5µM (β-actine), aliquotés et conservés à -20°C

Lors de l'achat d'un nouveau lot d'amorces ou de sondes, les solutions des nouveaux lots préparées sont vérifiées par la réalisation d'une rtRT-qPCR sur le contrôle interne en parallèle avec l'ancien lot.

amorces/sondes	Séquence (5'- 3')	Localisation	Réf.
FA-t-O-F- sens	5'-CCGAGACAGCGTTGGATAACA-3'	nt 3545-3565	2
FA-t-O-R reverse	5'-CCATACTTGCAGTTCCCGTTGT-3'	nt 3674-3653	2
FA-t-O-P sonde	**FAM** 5'- CCG ACT TGC ACT GCC TTA CAC GGC-3' **TAMRA**	nt 3603-3626	2
FA-t-A-F sens	5'-ACGACCATCCACGAGCTYC -3'	nt 3181-3199	2
FA-t-A-R reverse	5'- RCAGAGGCCTGGGACAGTAG -3'	nt 3244-3225	2
FA-t-A-P sonde	**FAM** 5'-CGT GCG CAT GAA ACG TGC CG-3' **TAMRA**	nt 3201-3220	2
FA-t-Asia-F- sens	5'-GCAGTWAAGGCYGAGASCATYAC-3'	nt 3751-3771	2
FA-t-Asia-R reverse	5'-GCARAGGCCTAGGGCAGTATG -3'	nt 3827-3807	2
FA-t-Asia-P sonde	**FAM** 5'-AGC TGT TGA TYC GCA TGA AAC GYG CG-3' **TAMRA**	nt 3777-3798	2
FA-t-SAT2-F- sens	5'-TGAAGAGGGCTGAGCTGTACTG-3'	nt 545-566* nt 3227-3248**	IAH Pirbright
FA-t-SAT2-R reverse	5'-CTCAACGTCTCCTGCCAGTTT -3'	nt 608-628*	
FA-t-SAT2-P sonde	**FAM** 5'-ACAGATTCGACGCGCCCATCG-3' **TAMRA**	nt 3366-3346**	IAH Pirbright
ACT-F sens	5'- CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C -3'	nt 1005-1029	3
ACT- R reverse	5'- CG GAC TCA TCG TAC TCC TG CTT -3'	nt 1135-1114	3
ACT P sonde	**VIC** 5'- TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T -3' **TAMRA**	1081-1105	3

Avec Y = C ou T W = A ou T R = A ou G I = inosine
Note : La numérotation des nucléotides (nt) du gène de la β actine se réfère à la publication de *Toussaint, et al. J. Virol. Methods, 2007.* La numérotation de nucléotides pour les couples : Type O avec la souche MAY/1/2004 (HQ632770) ; Type A avec la séquence complète de la polyprotéine d'un isolat PAK5/2006 (EF494488) ; Type Asia1 avec la souche 1/HNK/CHA/05 (EF149010).
Note (SAT2) : * complémentaire avec la souche SAT2 SUD/1/2007 (séquence VP1) (GU566071.1)
** complémentaire avec la souche SAT2 isolat provenant de Murchison Falls (génome complèt) (FJ461346.1)

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Extraire l'ARN viral à partir de 250 µL de suspension, comme indiqué dans le mode opératoire correspondant à l'extraction de l'ARN viral, à l'aide du TRIZOL et le reprendre dans 10µL d'eau RNAse free. Il est possible d'utiliser les kits d'extraction QIAGEN, à partir de 140 µL de suspension, en reprenant l'ARN dans 100µL d'eau RNAse free (par ex. Invitogen, réf. 46-2224).
- Pour chaque série de 1 à 10 échantillons réaliser l'extraction à partir d'un échantillon négatif correspondant à la même matrice que les échantillons à tester. En absence d'échantillon négatif faire l'extraction à partir d'une culture de cellule ZZ, BHK-21 ou IBRS2.

Recommandations :
- Respecter les recommandations classiques données, pour éviter les contaminations (aliquoter les prélèvements ; aliquoter les réactifs ; séparer les postes de travail ; utiliser de pointes à filtres ; porter des gants et les changer en tant que de besoin).
- Travailler avec du consommable stérile, à usage unique et RNase free.
- Ajouter des témoins négatifs d'extraction pour s'assurer de l'absence de contamination inter-échantillons en réalisant un témoin à partir d'un échantillon négatif (= témoin négatif)

- Réaliser un témoin en remplaçant l'échantillon par de l'eau ultra pure. (= Contrôle Blanc)
- Ces témoins négatifs d'extraction seront par la suite traités, comme des échantillons.
- Il est recommandé d'utiliser un témoin négatif et un contrôle blanc, tous les 8 à 10 échantillons testés

Contrôle Interne Positif et Négatif (β-actine):

Le contrôle interne idéal est un épithélium issu d'animaux infectés par chaque sérotype. Ce contrôle est utilisé comme un échantillon. A défaut d'avoir un épithélium positif, on peut contaminer une suspension d'épithélium négatif par du virus. Ces contrôles sont mis en aliquotes et conservés à -80°C.

En absence d'épithélium, le contrôle interne positif est effectué à partir de l'ARN extrait d'une suspension virale correspondant à chaque sérotype (O, A, Asia1). L'ARN positif repris dans de l'eau RNAse/DNAse free (Invitrogen ref.6-2224) additionnée du RNA carrier (Invitrogen ref. R8508) est aliquoté et conservé à -80°C.

Le contrôle interne négatif est effectué à partir de l'ARN extrait d'une suspension de cellules, repris dans de l'eau RNAse/DNAse free (Invitrogen ref.6-2224) additionnée du RNA carrier (Invitrogen ref. R8508) puis mis en aliquotes et conservé à -80°C. La dilution du contrôle utilisée est déterminée lors de l'établissement du contrôle et de la carte de contrôle de telle sorte qu'elle permet d'obtenir un Ct 2 à 3 fois inférieur au seuil de positivité. Pour le duplex, le contrôle Interne positif est préparé en mélangeant 1:1 (v/v) contrôle interne positif et contrôle négatif. 5µl de cette préparation est utilisé pour chaque cible en duplex. En parallèle, 5µl du contrôle négatif (β-actine positif) est utilisé pour chaque cible..

8. MODE OPERATOIRE

8.1 PREPARATION DE MIX

Préparation du mix RT-PCR : Pour chaque gène ciblé (Type O et β-actine, Type A et β-actine, Type Asia1 et β-actine, Type SAT2 et β-actine), préparer le mix pour toutes les réactions à réaliser (prévoir 1 ou 2 réactions supplémentaires), pour un volume final de 25 µL par réaction, selon les tableaux suivants :

Réactifs	Mix pour sérotypage de la FA					
	(FA Type O ou type A ou type Asia1 + β-actine)			**(FA Type Asia1 -β-actine)**		
	Concentration initiale	Volume par réaction (µl)	Concentration finale	Concentration initiale	Volume par réaction (µl)	Concentration finale
Eau Ultrapure (DNase RNase Free)		0,900			1.150	
Tampon 2X	2x	12,500	1x	2x	12,500	1x
Amorce sens (20µM)	20µM	1,000	0.8µM	20µM	1,000	0.8µM
Amorce antisens FA (20µM)	20µM	1,000	0.8µM	20µM	1,000	0.8µM
Sonde (FAM-TAMRA) (11.25µM)	11.25µM	1,000	0,45µM	10µM	0.750	0,3µM
Amorce sens B-actine 10µM	10µM	1,000	0.4µM	10µM	1,000	0.4µM
Amorce antisens B-actine 10µM	10µM	1,000	0.4µM	10µM	1,000	0.4µM
Sonde (VIC-TAMRA) (B-actine) 5µM	5µM	0,600	0.12µM	5µM	0,600	0.12µM
RT-PCR mix 25X (Enzyme)	25x	1,000	1x	25x	1,000	1x
Total à distribuer par puits (µL)	20,00			20,00		
Volume ARN à distribuer par puits	5µl			5µl		

- Répartir 20µL de mix dans chaque tube et ajouter 5µL d'ARN extrait (quelle que soit la méthode d'extraction : Trizol ou kit QIAGEN)
- Fermer les tubes avec les barrettes « optical caps ou sceller les microplaques avec un film optique». Vérifier la fermeture avec la roulette et centrifuger le tout, juste pour faire descendre, le contenu de chacun, à l'aide d'une microcentrifugeuse.

8.2 PROGRAMMATION DE L'APPAREIL PCR EN TEMPS REEL

De préférence programmer le thermocycleur avant la réalisation du mix RT-PCR, sinon conserver la plaque ou les tubes sur de la glace en fusion ou à + 5°C (± 3 °C), à l'abri de la lumière jusqu'à ce que le thermocycleur soit programmé. Démarrer le « run » rapidement, après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le thermocycleur.
Toutes les cibles sont lues en FAM ou VIC. Le Quencher (Tamra) est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive ROX pour les appareils ABI. La lecture de la fluorescence s'effectue à la fin de l'étape d'élongation qui est d'une minute à 60°C).

Etapes	Température	Temps	qt
Réverse transcription	45°C	10min	1x
Inactivation de la RT	95°C	10min	1x
Dénaturation	95°C	15sec	45x
Hybridation et élongation et lecture du signal	60°C	1min	

9. EXPRESSION DES RESULTATS

9.1. LECTURE

La lecture de la fluorescence s'effectue, à chaque cycle, à la fin de l'étape d'élongation qui est d'une minute à 60°C. Le cycle seuil « CT » (Cycle Threshold) est défini comme le numéro du cycle pour lequel l'intensité de fluorescence coupe la ligne de base ou « threshold ». Cette ligne de base est fixée manuellement ou automatiquement (par le logiciel de l'appareil).

9.2. VALIDATION DU TEST

L'essai est validé si :

- les NTC et les témoins négatifs d'extraction ont tous une valeur de CT indéterminée (UNDET)
- la valeur du Ct du contrôle interne positif répond aux critères de validation définis

Le résultat de chaque échantillon est validé si :

- le CT obtenu pour l'échantillon avec la RT-PCR de la B-actine est inférieur à 40 *Si le CT est égal ou supérieur à 40, ou encore indéterminé (UNDET), diluer les ARNs totaux non dénaturés au 1/5e dans de l'eau RNAse-DNAse free et recommencer les RT-PCR FA et B-actine, à partir de cette dilution.*
- *Si le CT de la B-actine est de nouveau égal ou supérieur à 40, ou encore indéterminé, recommencer l'extraction des ARNs totaux, en diluant l'échantillon au 1/2 dans du PBS pH7.4 (sans calcium, ni magnésium).*
- *Si le CT est de nouveau égal ou supérieur à 40, ou indéterminé, l'échantillon sera considéré comme inexploitable (présence d'inhibiteurs de RT-PCR ; échantillon lysé ou putréfié…).*

Remarque *:* Il est possible que certains échantillons soient pauvres en cellules par ex. le plasma ou suspension virale issue de culture cellulaire infectée et les valeurs de CT pour le gène du β-actine seraient toujours supérieurs à 40 ou indéterminés.

9.3. EXPRESSION DES RESULTATS

- L'échantillon est considéré négatif lorsque le CT obtenu avec la cible FA (sérotype O, A, Asia1 ou SAT2) est > **45**. Le résultat est rendu comme **« génome du virus de la fièvre aphteuse du sérotype concerné, non détecté »**.
- l'échantillon est considéré positif lorsque le CT obtenu avec la PCR FA est inférieur ou égal à **38**. Le résultat est rendu comme **« mise en évidence du génome du virus de la fièvre aphteuse, sérotype X ».**
- l'échantillon est considéré comme douteux, lorsque le CT obtenu avec la PCR FA est compris entre 38 et 45. Le test doit être renouvelé pour définir le statut de l'échantillon par rapport à l'infection.

MODE OPERATOIRE

Préparation des échantillons
pour la recherche du virus de la fièvre aphteuse

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Plusieurs types d'échantillons peuvent être utilisés pour la recherche virale: des fragments épithéliaux (lambeaux de parois d'aphte / vésicule), du liquide vésiculaire, du sang total, des surnageants de cultures cellulaires infectées.

La préparation des échantillons pour la recherche virale constitue l'étape préliminaire à la réalisation des différents tests de détection du virus de la fièvre aphteuse (détection du virus, d'un antigène viral ou du génome viral).

2. REFERENCES NORMATIVES

Méthode d'analyse officielle de l'Office International des Epizooties (OIE), décrite dans le chapitre 2.1.5. du Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres, publié en 2008.

3. DEFINITIONS

sans objet

4. PRINCIPE DE LA METHODE

Certains échantillons sont d'emblée utilisables sans préparation, d'autres non. C'est le cas en particulier des lambeaux d'épithélium qui demandent à être broyés et clarifiés et le surnageant de cultures cellulaires infectées qu'il est nécessaire de débarrasser des débris cellulaires.

5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- poste de sécurité microbiologique (PSM) de classe II
- enceinte réfrigérée : + 5 °C (± 3 °C)
- congélateur < -76°C
- centrifugeuse réfrigérée
- mortiers et pilons stériles
- balance (+/- 0,1 g)
- petit matériel courant de laboratoire (stérile) : erlenmeyers avec bouchon, béchers, éprouvettes graduées, barreaux magnétiques, tubes avec bouchon, microtubes de 1,5ml, cryotubes, pipettes …
- boîtes de Pétri
- pinces et scalpels à usage unique

6. REACTIFS ET PRODUITS

6.1. LISTE

- milieu de culture MEM (Earle's Minimum Essential Medium) Ref : 31095-029 Gibco (Invitrogen)
- eau distillée ou dé-ionisée
- mélange d'antibiotiques réf 15140-122 Gibco (Invitrogen): constitution du mélange = Penicillin G Sodium à 10 000 unités par ml et Streptomycine à 10 000µg par ml
- sable Ref. 27460-364 Prolabo à stérilisé
- Anios SPS 2000 réf. : 1059.515

6.2. PREPARATION

6.2.1. Préparation du milieu de culture cellulaire

Il s'agit d'un milieu de culture cellulaire additionné d'antibiotiques utilisé pour la préparation des échantillons et le recouvrement des tapis cellulaires après inoculation virale.

- Préparer du milieu MEM à 2% du mélange d'antibiotique et HEPES à 2,5 (facultatif)
- répartir ce milieu dans trois flacons :
  - ✓ Un flacon destiné à l'inoculation des cellules
  - ✓ Un flacon destiné à la préparation du broyat
  - ✓ Un flacon en réserve
- maintenir les flacons de milieu à température ambiante (20°C +/- 5°C) jusqu'à leur utilisation

6.2.2. Préparation du sable

Au préalable, stériliser le sable par autoclavage (cycle de 30 min à 121 °C), le répartir par aliquotes de 3 à 5 g et conserver à température ambiante (20°C +/- 5°C).

6.2.3. Préparation de la solution désinfectante

Utilisation d'une solution commerciale ANIOS
- conserver à température ambiante (20°C +/- 5°C).

7. MODE OPERATOIRE

7.1. LAMBEAUX D'APHTES

7.1.1. Echantillons envoyés à sec

- laver les fragments d'épithélium dans un peu de milieu de culture : pour cela, les saisir avec une pince stérile et les faire barboter dans un petit flacon rempli de ce milieu
- déposer les fragments d'épithélium dans une boite de pétri stérile
- les découper, si nécessaire, en petits fragments au moyen d'un scalpel et de la pince
- les peser
- les broyer dans un mortier avec un peu de sable stérile et de milieu de culture de manière à obtenir une suspension à 10% pds/vol (si pas assez de prélèvement faire une suspension à 5%)
- transférer le broyat dans un tube à centrifuger stérile
- centrifuger à 350xg, pendant 10 minutes, à + 5 °C (± 3 °C)
- recueillir le surnageant dans un tube stérile (éventuellement supportant la congélation)

- ce surnageant est utilisé comme matrice pour les analyses virologiques (ELISA de capture, isolement) et pour les analyses moléculaires (RT-PCR)
- conserver à + 5 °C (± 3 °C) jusqu'à utilisation le jour même (si non congeler à -80°C +/-5°C)

7.1.2. Echantillons envoyés en milieu de conservation contenant du glycérol

- laver les fragments d'épithélium au moins 6 fois en milieu de culture (le glycérol est toxique pour les cellules)
- poursuivre comme au paragraphe 7.1.1.

Lorsque le matériel est abondant, ne pas broyer tous les lambeaux d'aphtes mais en garder une partie en réserve pour des contrôles ultérieurs. Stocker ces fragments à -80°C +/- 5°C.

7.2. LIQUIDE VESICULAIRE

- le liquide vésiculaire est à utiliser directement, comme matrice pour les analyses virologiques (ELISA de capture, isolement) et pour les analyses moléculaires (RT-PCR)
- conserver + 5 °C (± 3 °C) jusqu'à utilisation le jour même (si non congeler à -80°C +/- 5°C)

7.3. SANG TOTAL OU SERUM

- le sang total (prélevé sans anticoagulant) est centrifugé pendant 10 min à 2000 tours / min pour récupérer le sérum
- le sérum sert de matrice pour les analyses sérologiques et pour les analyses moléculaires (RT-PCR)
- le sérum avec un peu d'hématies issues du culot sert de matrice pour l'isolement viral
- conserver le sérum + 5 °C (± 3 °C) jusqu'à utilisation les 48 heures (si non congeler à -20°C +-/ 5°C)

7.4. SURNAGEANTS DE CULTURES CELLULAIRES INFECTEES

- congeler à -80°C +/- 5°C et décongeler les cultures cellulaires infectées à analyser
- récupérer la suspension virale dans un tube à centrifuger stérile
- centrifuger à 350xg, pendant 10 minutes, à + 5 °C (± 3 °C)
- récupérer le surnageant dans un tube stérile
- ce surnageant peut servir de matrice pour les analyses virologiques (ELISA de capture, second passage sur culture cellulaire) et pour les analyses moléculaires (RT-PCR)
- conserver + 5 °C (± 3 °C) jusqu'à utilisation le jour même (si non congeler à -80°C +/- 5°C)

MODE OPERATOIRE

Recherche du virus de la fièvre aphteuse
par détection de l'ARN génomique par RT-PCR classique

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce test est utilisé pour le diagnostic virologique de fièvre aphteuse lors de suspicion clinique (en complément de l'isolement viral sur culture cellulaire), pour une surveillance sanitaire ou pour un certificat d'exportation (en remplacement de l'isolement viral sur culture cellulaire).
De plus, ce test permet de réaliser la caractérisation moléculaire d'une souche virale par séquençage du produit d'amplification de l'extrémité 3' du gène codant pour la protéine VP1.

2. REFERENCES NORMATIVES

Méthode d'analyse reconnue par l'Office International des Epizooties (OIE) dans le chapitre 2.1.1. du Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres publié en 2005.

Références bibliographiques :

- ***1.*** *Laor O, Torgersen H, Yadin H, Becker Y.* Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Methods, 1992, 36 : 197-208.*
- ***2.*** *Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, Samuel AR, Knowles NJ.* Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods, 2000, 89 : 167-176.*
- ***3.*** *Beck E, Strohmaier K.* Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol., 1987, 61 : 1621-1629.*
- ***4.*** *Amaral-Doel CMF, Owen NE, Ferris NP, Kitching RP, Doel TR.* Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine-inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine, 1993, 11 : 415-421.*
- ***5.*** *Vangrysperre W, De Clercq K.* Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol., 1996, 141 : 331-344.*
- ***6.*** *Alexandersen S, Forsyth MA, Reid SM, Belsham GJ.* Development of reverse transcription-PCR (oligonucleotide probing) enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis and preliminary typing of foot-and-mouth disease : a new system using simple and aqueous-phase hybridization. *J. Clin. Microbiol., 2000, 38 : 4604-4613.*
- ***7.*** *Reid SM, Forsyth MA, Hutchings GH, Ferris NP.* Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods, 1998, 70 : 213-217.*
- ***8****. King PD, Ferris NP,Shaw AE, Reid SM, Hutchings GH, Giuffre AC, Robida JM, CallahanJD, Nelson WM, Beckham TR.* Detection of foot-and mouth disease virus: comparative diagnostic sensibility of two independent real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. J Vet Diagn Invest, 2006, 18:93-97.
- ***9.*** Ayelet G, Mahapatra M , Gelaye E, Egziabher BG, Rufeal T, Sahle M, Ferris NP, Wadsworth J, Hutchings GH, and Knowles NJ. Genetic Characterization of Foot-and-Mouth Disease Viruses, Ethiopia, 1981-2007. Technical appendix (Table 2) Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 15, No. 9, September 2009
- ***10.*** *Van Phan Le, Kwang-Nyeong Lee, Tung Nguyen, Su-Mi Kim, In-Soo Cho, Dong Van Guyen, Dinh Duy Khang, Jong-Hyeon Park*. Development of one-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection and differentiation of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A, and Asia 1circulating in Vietnam. J Virol Methods. 2011 Jul;175(1):101-8. Epub 2011 Apr 29.

3. DEFINITIONS

matrice : sérum ou plasma, clarifiat de broyat de lésion (vésicules), suspension virale issue de culture cellulaire infectée, ARN extrait
analyte : ARN génomique du virus de la fièvre aphteuse (tout sérotype)
RT : transcription inverse
PCR : amplification en chaîne par polymérisation

4. PRINCIPE DE LA METHODE

Après extraction des ARN, le test repose dans un premier temps sur la transcription inverse (RT) de l'ARN du virus de la fièvre aphteuse en ADN complémentaire. L'ADNc obtenu est dans un second temps amplifié (PCR) par une ADN polymérase qui utilise des amorces ciblant des régions très conservées dans le génome viral, permettant ainsi la détection des 7 sérotypes. Les deux réactions enzymatiques sont réalisées dans un même tube (one-step RT-PCR).
En raison du taux élevé de mutations lors de la réplication des virus à ARN, il est recommandé d'utiliser simultanément au moins 2 des 3 couples d'amorces spécifiques disponibles.

5. APPAREILLAGE ET MATERIELS

- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Bac réfrigérant
- Bain à sec
- Glace pilée
- Centrifugeuse de paillasse
- Microcentrifugeuse de paillasse
- Vortex
- Matériels de pipetage et de micropipetage
- Pointes à filtres RNAse et DNAse free de 10, 20, 200 et 1000µl
- Microtubes de 0,2 ml, 1,5 ml et de 2 ml RNAse et DNAse free
- Tubes de 50 ml stériles
- Consommable plastique (plaques, microtubes, barrettes….)
- Thermocycleur
- Matériels nécessaires pour la révélation par migration sur gel d'agarose (four à micro-onde, cuve d'électrophorèse, générateur, trans-illuminateur UV, caméra/appareil photo, …)

6. REACTIFS ET PRODUITS

6.1. TROUSSE DE RT-PCR ET AMORCES

- Kit One-step RT-PCR : réf 210212 (QIAGEN), conservé à – 20 °C (< - 16 °C)
- Amorces sens et antisens : solutions à 100 picomoles/µl, aliquotées et conservées à -20°C.

6.2. AMORCES (TABLEAUX DES SEQUENCES)

Plusieurs couples d'amorces sont décrits dans ce mode opératoire (tableaux 1, 2 et 3).Les amorces du tableau 1 sont utilisées pour amplifier et séquencer la région VP1 de la FA celles du tableau 2 sont utilisées pour amplifier certaines régions du génome (par ex IRES ou 3D), enfin les amorces du tableau 3 sont utilisées pour le sérotypage de la fièvre aphteuse.

Tableau 1 : Couples d'amorces utilisés pour amplification et séquençage de la région VP1 (recommandés par IAH Pirbright, laboratoire international de référence pour la FA), permettant une étude phylogénétique, une caractérisation de sérotype, et la création d'arbres phylogénétiques (voir référence n°9)

Séro type	Sens	Nom	Amorce (5'-3')	Région	Taille de fragment obtenu
O	Forward	1C-244F	GCAGCAAAACACATGTCAAACACCTT	VP3	1155bp
O	Forward	1C-272F	TBGCRGGNCTYGCCCAGTACTAC	VP3	1130bp
O	Forward	1C-283F	GCCCAGTACTACACACAGTACAG	VP3	1119bp
A	Forward	1C-562F	TACCAAATTACACACGGGAA	VP3	846bp
A	Forward	1C-612F	TAGCGCCGGCAAAGACTTTGA	VP3	795bp
C	Forward	1C-536F	TACAGGGATGGGTCTGTGTGTACC	VP3	837bp
C	Forward	1C-616F	AAAGACTTTGAGCTCCGGCTACC	VP3	793bp
Asia	Forward	As1-1C505F	TACACTGCTTCTGACGTGGC	VP3	894bp
Asia	Forward	As1-1C530F	CCACRAGTGTGCARGGATGGGT	VP3	867bp
Asia	Forward	As1-1C613F	GCCGGCAARGAYTTTGAGTTYCG	VP3	805bp
Asia	Forward	As1-1C616F	GGCAAGGACTTTGAGTTTCGC	VP3	802bp
O, A, C, Asia	Reverse	EUR-2B52R	GACATGTCCTCCTGCATCTGGTTGAT	2B	cf forward
SAT1	Forward	1C-559F	GTGTATCAGATCACAGACACACA	VP3	1020bp
SAT1	Forward	1U-OSF	GTGTACCAGATCACTGACAC	VP3	1023bp
SAT2	Forward	1C-445F	TGGGACACMGGIYTGAACTC	VP3	1125bp
SAT2	Forward	P1-1223F	TGAACTACCACTTCATGTACACAG	VP3	1255bp
SAT1, SAT2	Reverse	SAT2B208R	ACAGCGGCCATGCACGACAG	2B	cf forward

Tableau 2 : Couples d'amorces permettant l'amplification de certaines régions du génome de la FA (par ex. détection)

Sérotype	Région	Séquence (5'- 3')	Localisation	Taille attendue	Réf.
tous	IRES1 *sens*	CCT GGT CTT TCC AGG TCT AGA	nt 667-687		6
tous	IRES4 *reverse*	CCT ATT CAG GCG TAG AAG CTT	complémentaire à nt 1042-1022	375 bp	6
tous	3D *sens*	TTC GAG AAC GGC ACG GTC GGA	nt 6790-6811		1
tous	3D *reverse*	GTA AAG TGA TCT GTA GCT TGG	complémentaire à nt 7747-7766	957bp	1
Tous*	IRES sens	CGT CHG CGC ACG AAA CGC	nt 581-598		
Tous*	IRES reverse	RCG ATR AAR CAG TCR GTY R	complémentaire à nt 1108-1123	527 bp	8
Tous*	3D sens	GAC AAA GGT TTT GTT CTT GGT CA	nt 7795-7817		
Tous*	3D reverse	TCA CCG CAC ACG GCG TTC A	complémentaire à nt 8090-8072	295 bp	8
tous sauf type C	VP1 *sens*	CCT ACC TCC TTC AAC TAC GG	nt 3454-3464	195 bp	3, 4
type C	P40 (VP1 C) *sens*	GTT TCT GCA CTT GAC AAC ACA -	nt 3259-3279	390 bp	5
tous	NK72 (2A) *reverse*	GAA GGG CCC AGG GTT GGA CTC	complémentaire à nt 3649-3670	NA	3, 4
SAT2 Lyb,Egy	SAT2 Fcl	GTAACCCGCTTTGCCATC	nt 333-351 ** nt 3019-3032	288bp *286bp	IAH
SAT2 Lyb,Egy	SAT2 Rcl	CGCGTCGAATCTGTCTCTG	nt 621-603 ** nt 3301-3285		IAH

Note : la numérotation des nucléotides (nt) se réfère à la publication de *Forss S. et al., NAR, 1984, 12 :6587-6601,* sur le séquençage de la souche O1K.
* amorces complémentaire avec la souche O1 manisa (AY593823.1)
**amorces pour type SAT2 complémentaire avec le sérotype SAT2 SUD/1/2007 (VP1) (GU566071) et avec le génome complète d'isolat de SAT2 de buffle n° 6 QE (HM067704.1)

Tableau 3 : Couples d'amorces pour le sérotypage O, A et Asia (souche d'Asie) en multiplex

Sérotype	Nom	Séquence (5'- 3')	Localisation	Taille attendue	Réf.
O	VN-OF sens	AGATTTGTGAAAGTDACACCA	nt 3376-3396	650bp	10
A	VN-AF sens	CTTGCACTCCCTTACACCGCG	nt 3609-3629	416bp	10
Asia1	VN-AsiaF sens	GCGSTHRYYCACACAGGYCCGG	nt 3585-3606	521bp	10
Tous	VN-VP1R reverse	CATGTCYTCYTGCATCTGGTT	nt type O : 4026-4006 nt type A : 4025-4005 nt type Asia : 4106-4086	NA	10

Note :
- amorces pour type O complémentaire avec le sérotype O de la souche MAY/1/2004 (HQ632770)
- amorces pour type A complémentaire avec le sérotype A de la souche MAY/3/2007(HQ632773)
- amorces pour type Asia1 complémentaire avec le sérotype Asia1 d'isolat n° IND 148-01 (DQ989317)

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Extraire l'ARN viral à partir de 250 µl de suspension comme indiqué dans le mode opératoire correspondant à l'extraction de l'ARN viral à l'aide du TRIZOL. Reprendre l'ARN dans 10µl d'eau RNAse free. Il est possible d'utiliser les kits d'extraction QIAGEN à partir de 140 µl de suspension et reprendre dans 100µl. (voir les MO correspondants).
- Inclure des contrôles négatifs et positifs pour chaque cible.

Recommandations :
- Respecter les recommandations classiques données pour éviter les contaminations (mise en aliquote des prélèvements ; mise en aliquote des réactifs ; séparation des postes de travail ; utilisation de pointes à filtres ; port de gant).
- Travailler avec du consommable stérile RNase free.
- Ajouter des témoins négatifs d'extraction pour s'assurer de l'absence de contamination inter-échantillons. Prendre un volume d'eau identique à la prise de volume préconisé pour l'échantillon, et ces témoins négatifs d'extraction seront par la suite traités comme des échantillons.

8. MODE OPERATOIRE

8.1 PREPARATION

Préparation du mix RT-PCR : placer un tube dans la glace et préparer le mix pour toutes les réactions voulues (prévoir 1 ou 2 réactions supplémentaires) sous le volume final de 25 µl, soit pour 1 réaction :

Réactif	Volume pour une réaction (µl) Séquençage ou détection	Volume pour une réaction (µl) Multiplex
Eau RNAse Pure	12,6	12,6
Tampon 5X One-Step RT-PCR	5,0	5,0
dNTPs (mix)	1,0	1,0
Amorce Forward (100µM)	0,2	
Amorce Forward Type O (100µM)		0,2
Amorce Forward Type A (100µM)		0,2
Amorce Forward Type Asia1 (100µM)		0,2
Amorce Reverse (100µM)	0,2	0,2
One–Step RT-PCR enzyme Mix	1,0	1,0
Total à distribuer par puits (µL)	**20µl**	**20µl**
Volume ARN à distribuer par puits	5µl	5µl

- Répartir 20 µl dans chaque tube ou cupule nécessaire (sur glace en fusion) et ajouter 5 µl d'ARN extrait

8.3 PROGRAMMATION DE L'APPAREIL PCR

Conserver la plaque ou les tubes sur glace en fusion ou à + 5°C (± 3 °C) jusqu'à ce que le thermocycleur soit programmé, puis démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le thermocycleur.
Il existe plusieurs programmes différents suivants les couples des amorces utilisées.

	VP1 type O (séquençage)	VP1 type A et Asia1 (séquençage)	VP1 type SAT1 et SAT2 (séquençage)	Amplification IRES et 3D de la FA	Détection type SAT2 (Lybie et Egypte) et sérotypage en multiplex
nom	**FATO60**	**FATAAS55**	**FASAT50**	**FAIR3D**	**FAMULT58**
RT	30min à 50°C	30min à 50°C	30min à 50°C	30min à 50°C	30min à 50°C
Activation Hot Start Taq	10min à 95°C	10min à 95°C	10min à 95°C	10min à 95°C	10min à 95°C
Nombre de cycles	35	35	35	40	35
Dénaturation	1min à 95°C	1min à 95°C	1min à 95°C	1min à 95°C	1min à 95°C
Hybridation	1min à 60°C	1min à 55°C	1min à 50°C	1min à 55°C	1min à 58°C
Elongation	1,5min à 72°C	1,5min à 72°C	1,5min à 72°C	1min à 72°C	1min à 72°C
Elongation finale	5min à 72°C	5min à 72°C	5min à 72°C	5min à 72°C	10min à 72°C
Stand by	15°C	15°C	15°C	15°C	15°C

9. EXPRESSION DES RESULTATS

9.1. ELECTROPHORESE

Voir MO spécifique.
Utiliser le marqueur de poids moléculaires VI ,VII ou XI (Boehringer)

9.2. VALIDATION DU TEST

L'essai est validé si :

- aucune bande n'est visible pour les témoins négatifs d'extraction et de RT-PCR,
- une bande (unique) à la taille attendue est visible pour les témoins positifs de RT-PCR (voir les tableaux avec les couples d'amorces)

9.3. EXPRESSION DES RESULTATS

L'expression des résultats dépend des couples d'amorces utilisés et de l'objectif de l'essai réalisé :

1. Séquençage (VP1 : sérotype O,A,C, Asia1 et SAT1-2-3)
2. Détection du génome de la FA (IRES et 3D) ou détection du sérotype SAT2 (Lybie, Egypte)
3. Sérotypage de la Fièvre Aphteuse (O, A ou Asia1) en multiplex

Pour le cas n°1
Une bande unique, bien visible sur un gel à la taille attendue : l'ADN peut être envoyé pour le séquençage (effectué par MWG).

Pour le cas n°2
Quand l'essai est validé :

- l'échantillon est considéré négatif lorsqu'il y a absence de la bande spécifique. Le résultat est rendu comme **« génome du virus de la fièvre aphteuse non détecté »**.
- l'échantillon est considéré positif lorsqu'il y a présence de la bande spécifique. Le résultat est rendu comme **« détection du génome du virus de la fièvre aphteuse ».**

Pour le cas n°3
Quand l'essai est validé :
La taille de la bande sur un gel caractérise un échantillon soit au tant que type O, type A ou bien type Asia1.

anses
alimentation, environnement, travail

ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE :

La biosécurité au laboratoire manipulant le FMDV vivant

21 mai 2012

Sébastien ALLIX, agent du Biorisque
Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort

1. Agents Biologiques – Classification « humaine » France

Arrêté du 18/07/1994 fixant la liste des agents pathogènes

Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Non Pathogène	Pathogène	Hautement Pathogène	Mortelle
	Epidémie Epizootie		Pandémie Panzootie
	Faible ou nulle	Nulle, faible, importante	Importante
Hôtes commensaux	*B. pertussis, legionella sp,* *E Coli sauf O157H7* *Influenza type A, B et C, Papillomavirus* *Trichinella sp, Toxoplasma sp.* *Aspergillus fumigatus*	*B. anthracis, Brucella sp* sauf *B. ovis* *E coli O157:H7** West Nile, F. vallée du Rift, F. jaune HIV*, HCV*, HBV*, HEV*, Rage* Prion* *E. multilocularis*, P. facliparium** *Coccidoides immitis*	Virus Ebola, Marbourg, Variole, Morbillivirus équin Crimée-Congo

1. Agents Biologiques – Classification « animale » France

Classification en fonction des 6 critères :

1. *Importance géographique*
2. *Transmissibilité inter-espèces*
3. *Existence et nature des vecteurs ou porteurs*
4. *Incidence économique et/ou médicale*
5. *Mesure(s) particulière(s) de confinement.*
6. *Existence de prophylaxie et/ou un traitement efficace ;*

= 4 classes de risques notées Ea [0-3]

1. Agents Biologiques – Classification « animale » France

Critères	Ea0	Ea1	Ea2	Ea3
Importance géographique	Ne provoque pas de maladie chez les animaux	Limitée	Limitée	Majeure
Transmissibilité inter-espèces		Faible ou nulle	Peut être importante	Oui, très importante
Existence et nature des vecteurs ou porteurs		Non	Peut exister	Oui, identifié
Incidence économique et/ou médicale		Limitée	Limitée	Majeurs
Mesure(s) particulière(s) de confinement.		Non	Oui, niveau 2 ou 3 OMS	Oui, au moins niveau 3 OMS
Existence de prophylaxie et/ou un traitement efficace		Oui	Oui	Pas de traitement Abatage massif des animaux dans le zone concernée

2. Les mesures pratiques

NORMES MINIMALES POUR LES LABORATOIRES TRAVAILLANT SUR LE VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE *in vitro* ET *in vivo*

1. **Politique du risque**
2. **Politique de formation**
3. **Mesures biosécurité dans le laboratoire**
4. **Personnel**
5. **Conception de l'installation**
6. **Mesures pour la manipulation du virus de la FA**
7. **Traitement d'air**
8. **Gestion des déchets**
9. **Equipement et matériels**
10. **Déclassement du confinement de compartiments pour des raisons de maintenance ou de rénovation**

eofmd
european commission for the control of foot-and-mouth disease

2. Les mesures pratiques

1. Politique du risque

Organisation de la biosécurité au sein du laboratoire :

- politique formelle
- engagement du directeur du laboratoire
- BRO
- procédures normalisées d'exploitation
  Norme ISO17025, CWA15793
- traçabilité de toutes les opérations de manipulation du FMDV
- système d'analyse des incident accidents

2. Formation

- personnel du laboratoire (tutorat)
- personnel technique
- visiteur

2. Les mesures pratiques

3. Mesures de biosécurité

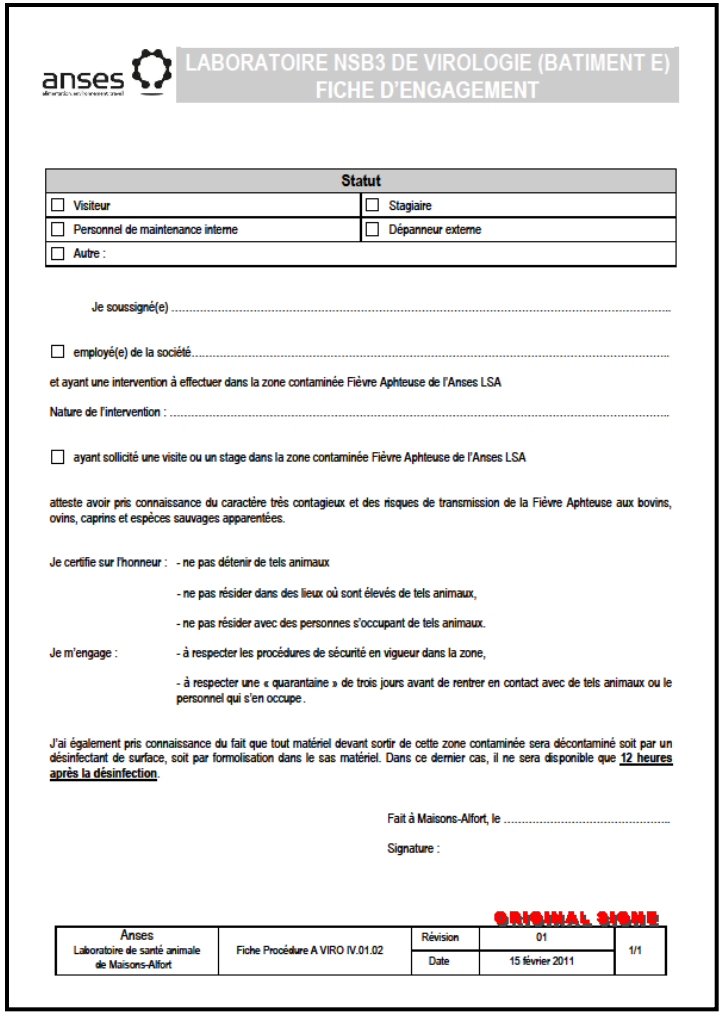
vise à empêcher toute sortie délibérée du virus de l'installation ou du site (vol ou détournement)

4. Personnel

-qualification
-engagement
-surveillance
-mesures strictes pour les visiteurs : engagement

REMPLIR LA FICHE « Procédure A VIRO IV.01.02 »

2. Les mesures pratiques



anses

LABORATOIRE NSB3 DE VIROLOGIE (BATIMENT E)
FICHE D'ENGAGEMENT

Statut	
☐ Visiteur	☐ Stagiaire
☐ Personnel de maintenance interne	☐ Dépanneur externe
☐ Autre :	

Je soussigné(e) .....

☐ employé(e) de la société.....

et ayant une intervention à effectuer dans la zone contaminée Fièvre Aphteuse de l'Anses LSA

Nature de l'intervention : .....

☐ ayant sollicité une visite ou un stage dans la zone contaminée Fièvre Aphteuse de l'Anses LSA

atteste avoir pris connaissance du caractère très contagieux et des risques de transmission de la Fièvre Aphteuse aux bovins, ovins, caprins et espèces sauvages apparentées.

Je certifie sur l'honneur : - ne pas détenir de tels animaux

- ne pas résider dans des lieux où sont élevés de tels animaux,

- ne pas résider avec des personnes s'occupant de tels animaux.

Je m'engage : - à respecter les procédures de sécurité en vigueur dans la zone,

- à respecter une « quarantaine » de trois jours avant de rentrer en contact avec de tels animaux ou le personnel qui s'en occupe.

J'ai également pris connaissance du fait que tout matériel devant sortir de cette zone contaminée sera décontaminé soit par un désinfectant de surface, soit par formolisation dans le sas matériel. Dans ce dernier cas, il ne sera disponible que **12 heures après la désinfection**.

Fait à Maisons-Alfort, le .....

Signature :

ORIGINAL SIGNE

Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort	Fiche Procédure A VIRO IV.01.02	Révision	01	1/1
		Date	15 février 2011	

Votre engagement pendant cet atelier

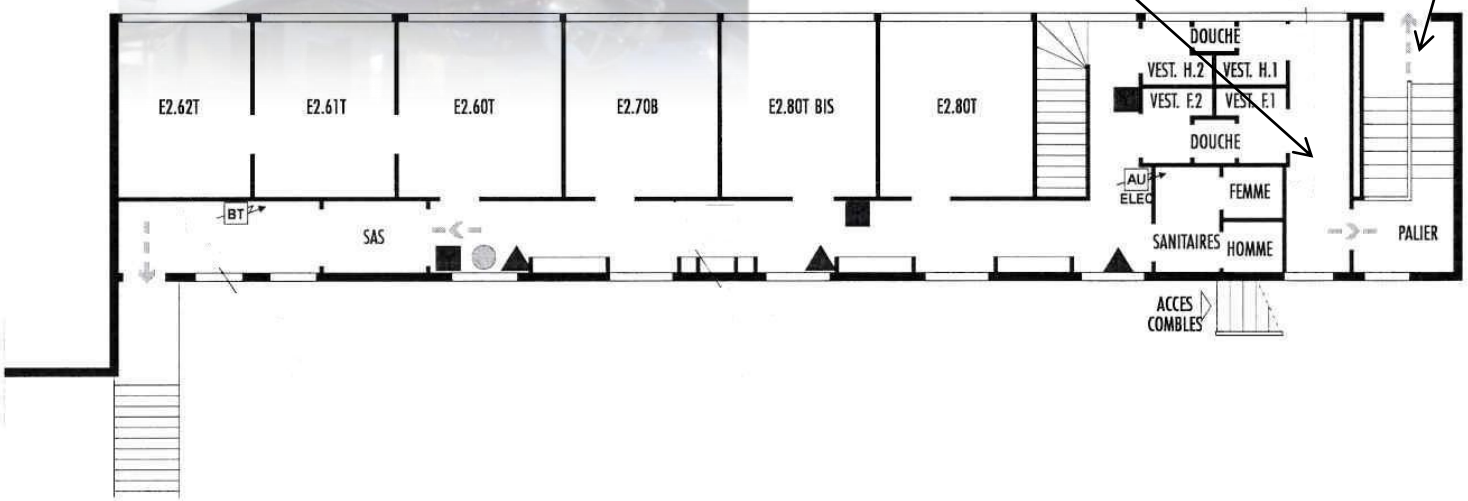
1. Lire
2. Remplir
3. Signer
4. Remettre au BRO

5. Conception des installations

-locaux en dépression
-haut niveau d'étanchéité
-fenêtres scellées, incassable
-portes verrouillées et contrôles

-murs, sols et plafonds appropriés et faciles à nettoyer
-systèmes de communication avec l'extérieur
-Energie de secours en cas de panne de courant

Les consignes pour l'accès au laboratoire



Les consignes pour l'accès au laboratoire HOMMES

ENTREE

1. Entrée dans le SAS 1 – Attention ne pas marcher avec ses chaussures sur caillebotis bleu
2. Se déshabiller entièrement (utiliser les cintres et casiers)
   Mettre un slip jetable
1. Passer par la douche pour accéder dans le SAS 2
2. SAS2 : S'habiller avec les vêtements mis à votre disposition
3. Entrée en zone (couloir du haut)

SORTIE

1. SAS 2 : Se déshabiller entièrement : jeter le slip jetable (poubelle), mettre les tenues de laboratoire sur le patère à votre nom
2. Douche avec rinçage du nez et shampoing obligatoire
3. SAS 1 : prendre une serviette propre dans l'étagère et s'essuyer
   Se rehabiller
4. Sortir en prè-zone

Les consignes pour l'accès au laboratoire FEMMES

ENTREE

1. Entrée dans le SAS 1 – Attention ne pas marcher avec ses chaussures sur caillebotis bleu
2. Se déshabiller entièrement (utiliser les cintres et casiers)
   Mettre un slip jetable
1. Passer par la douche pour accéder dans le SAS 2
2. SAS2 : S'habiller avec les vêtements et sous vêtements (haut du corps) mis à votre disposition
3. Entrée en zone (couloir du haut)

SORTIE

1. SAS 2 : Se déshabiller entièrement : jeter le slip jetable (poubelle), mettre les tenues de laboratoire et sous vêtements (haut du corps) sur le patère à votre nom
2. Douche : rinçage du nez et shampoing obligatoire
3. SAS 1 : prendre une serviette propre dans l'étagère et s'essuyer
   Se rehabiller
4. Sortir en prè-zone

2. Quelques définitions importantes avant de passer à la suite

confinement : action visant à maintenir un agent biologique ou une autre entité à l'intérieur d'un espace déterminé.

confinement primaire : système de confinement qui empêche le passage d'un agent biologique dans **l'environnement de travail immédiat**. Ce système repose sur l'utilisation de **récipients fermés** ou de **hottes de sécurité biologique** et de **méthodes de travail** comportant des précautions particulières.

confinement secondaire : système de confinement qui empêche le passage d'un agent biologique dans **l'environnement extérieur ou dans d'autres zones de travail**. Ce système repose sur l'utilisation de pièces équipées d'un dispositif de **traitement de l'air** spécialement conçu à cet effet, sur l'existence de sas et de stérilisateurs pour la sortie du matériel ainsi que sur des méthodes de travail comportant des précautions particulières. Dans de nombreux cas, il complète l'efficacité du confinement primaire.

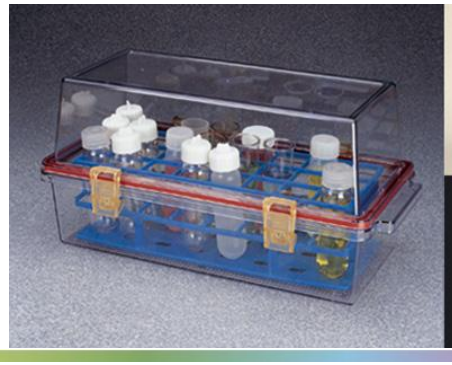
6. Mesures pour la manipulation

Identifier les situations à risques liés aux techniques

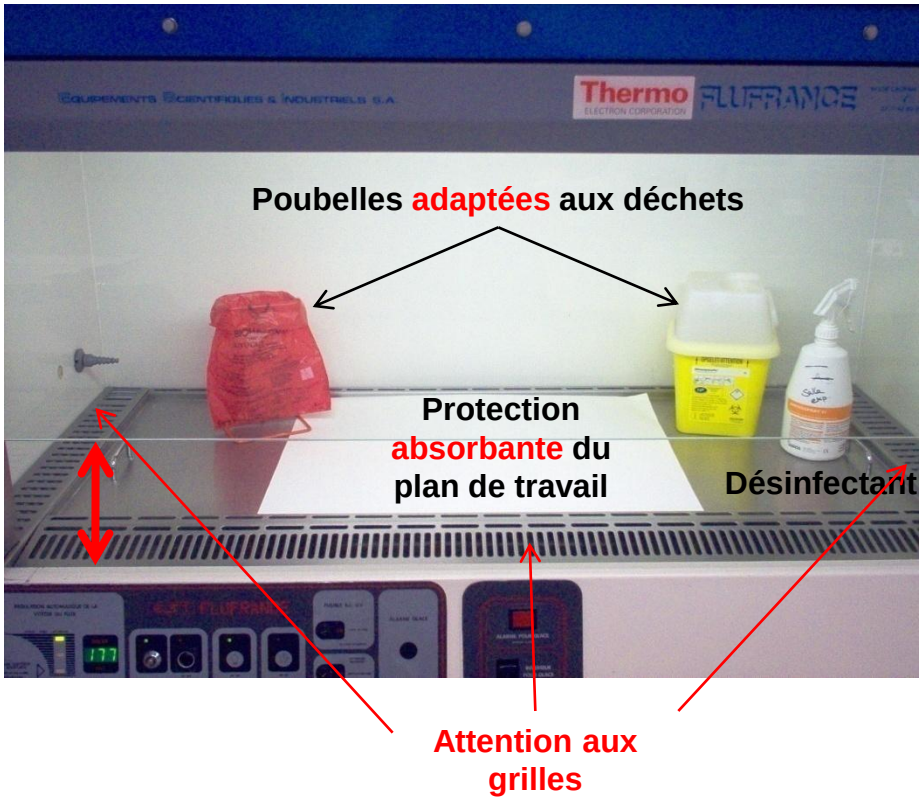
- Risques de production d'aérosols
  - flambage
  - dilacération, broyage, homogénéisation
  - agitation manuelle ou mécanique
  - sonication
  - centrifugation

Identifier les situations à risques liés aux matériels

Transport interne étanche:



Organiser son poste de travail
= limiter le risque de diffusion



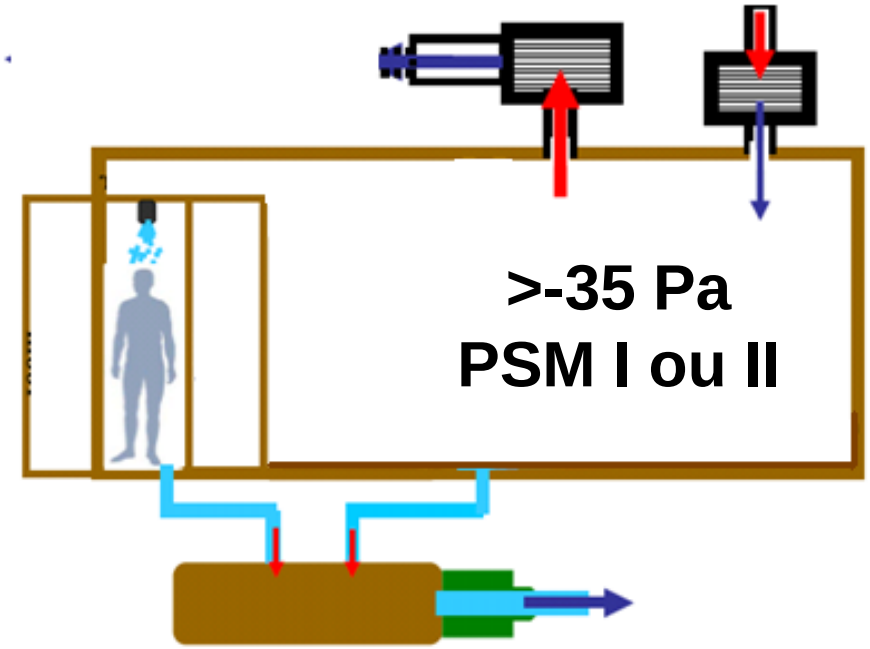
A proximité :

7. traitement de l'air

Laboratoire manipulant moins de 10L de virus vivants

2 x H14 si travail hors PSM

Hepa ou REM

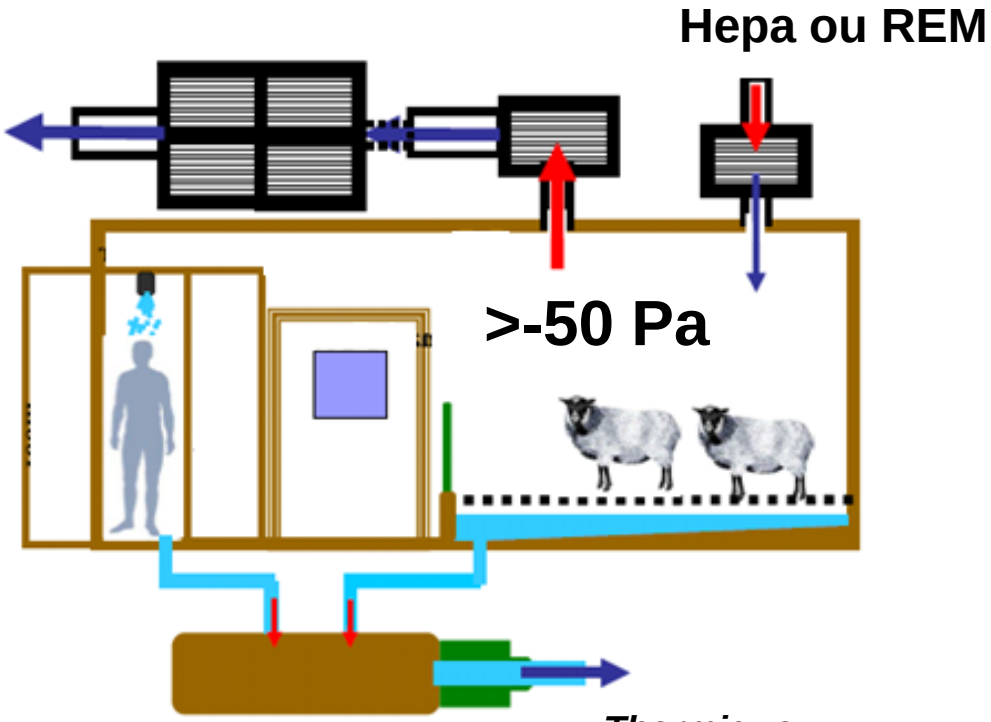


Chimique :
ex NaOH ou d'autres traitements alcalins à pH 12, pendant au moins 10 heures

Thermique:
Ex: chauffage à 100 ℃ pendant 1 heure

7. traitement de l'air

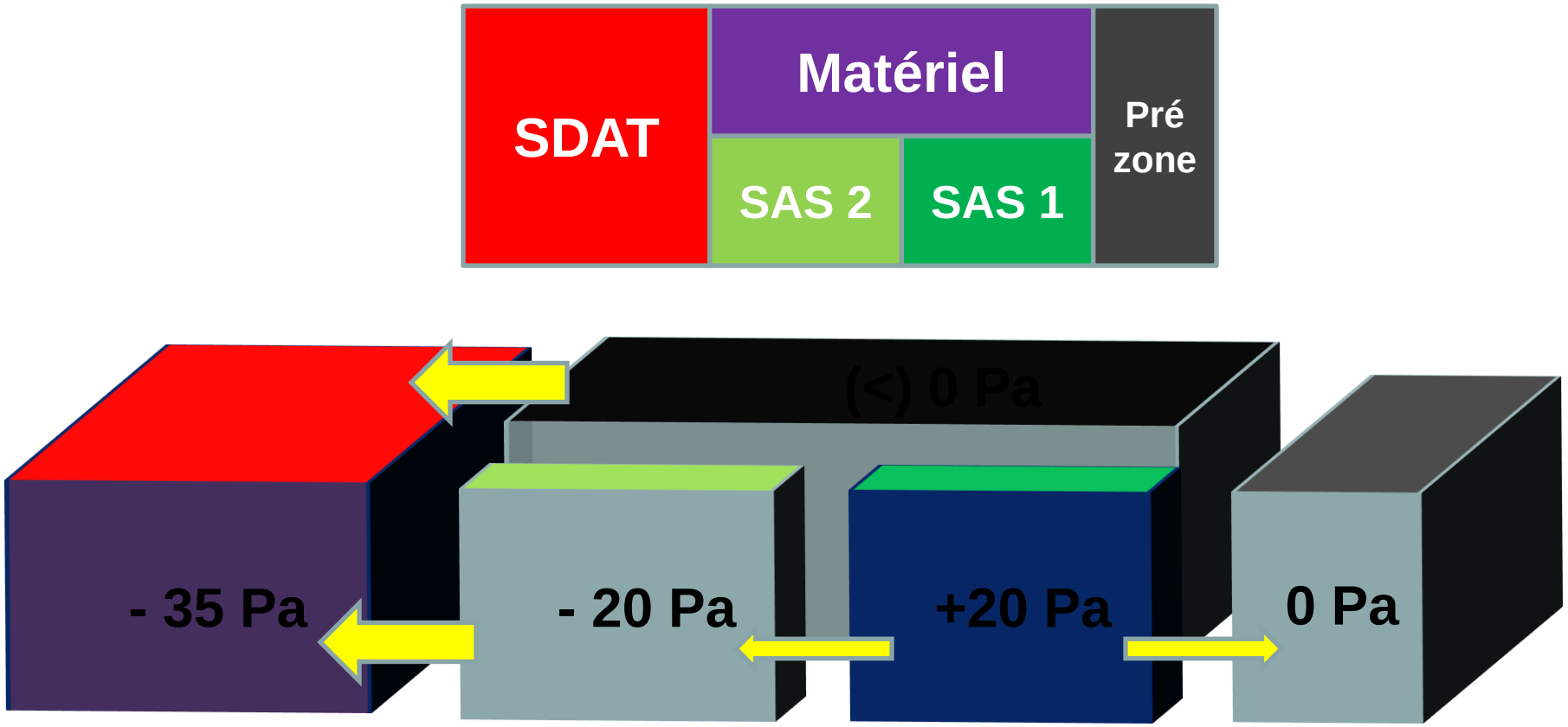
Laboratoire de production (>10L) ou animalerie



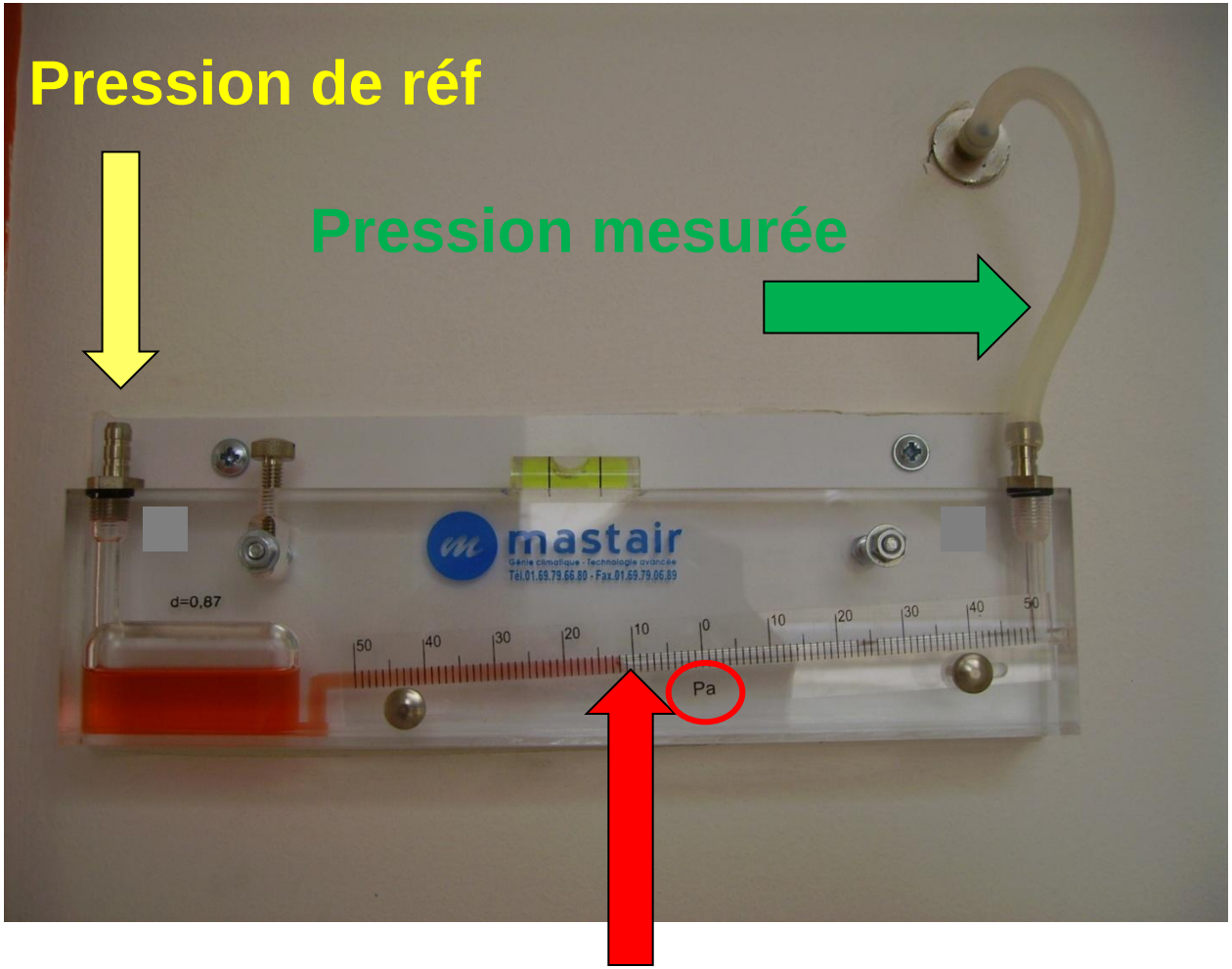
Chimique :
ex NaOH ou d'autres traitements alcalins à pH 12, pendant au moins 10 heures

Thermique:
Ex: chauffage à 100 ℃ pendant 1 heure

Principe général de confinement par l'aéraulique



Lecture de déprimomètres

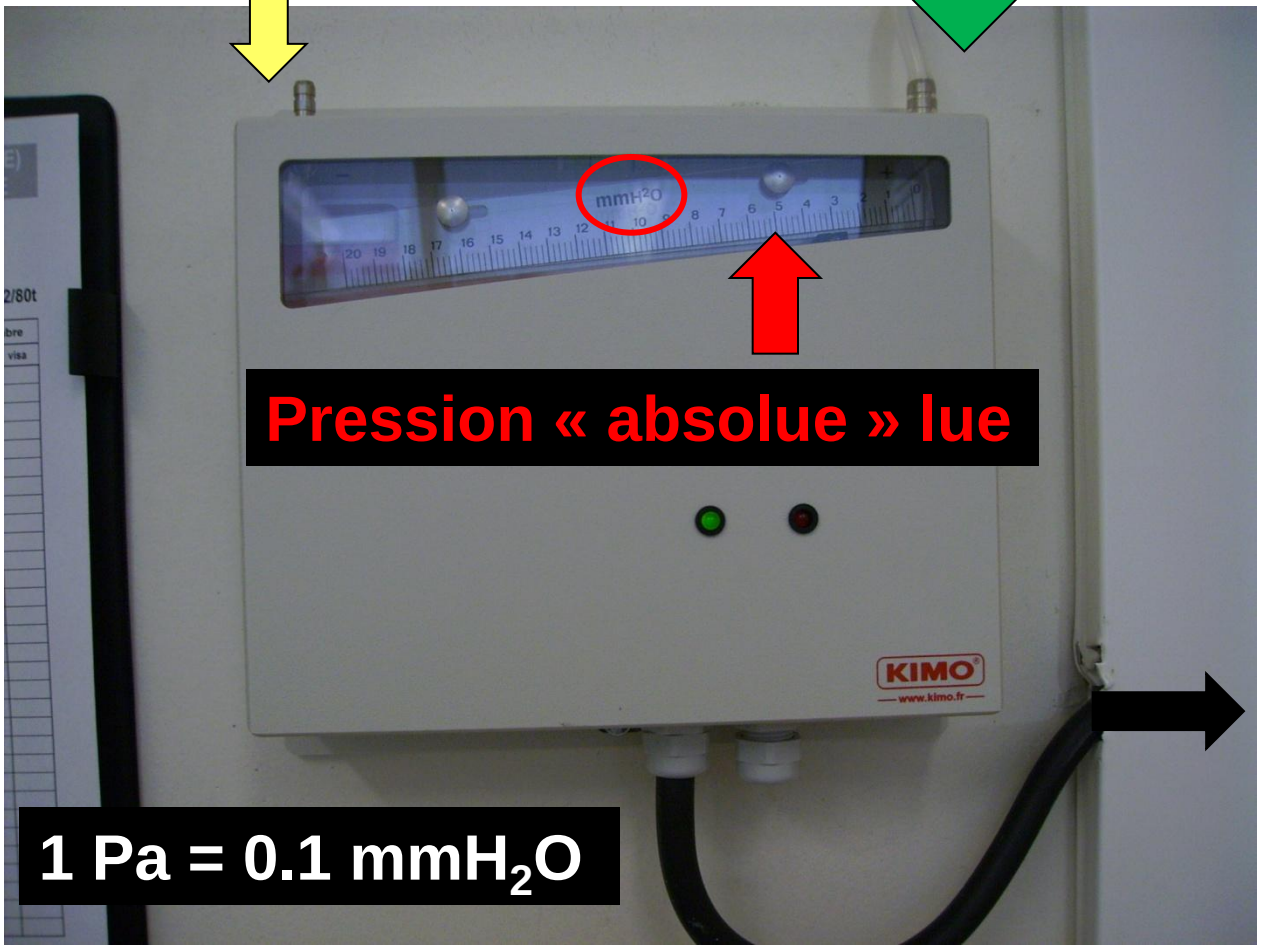


Pression « relative » lue

2. Les mesures pratiques

Pression de la pièce

Pression mesurée : Patm



Pression « absolue » lue

ALARME

1 Pa = 0.1 mmH_2O

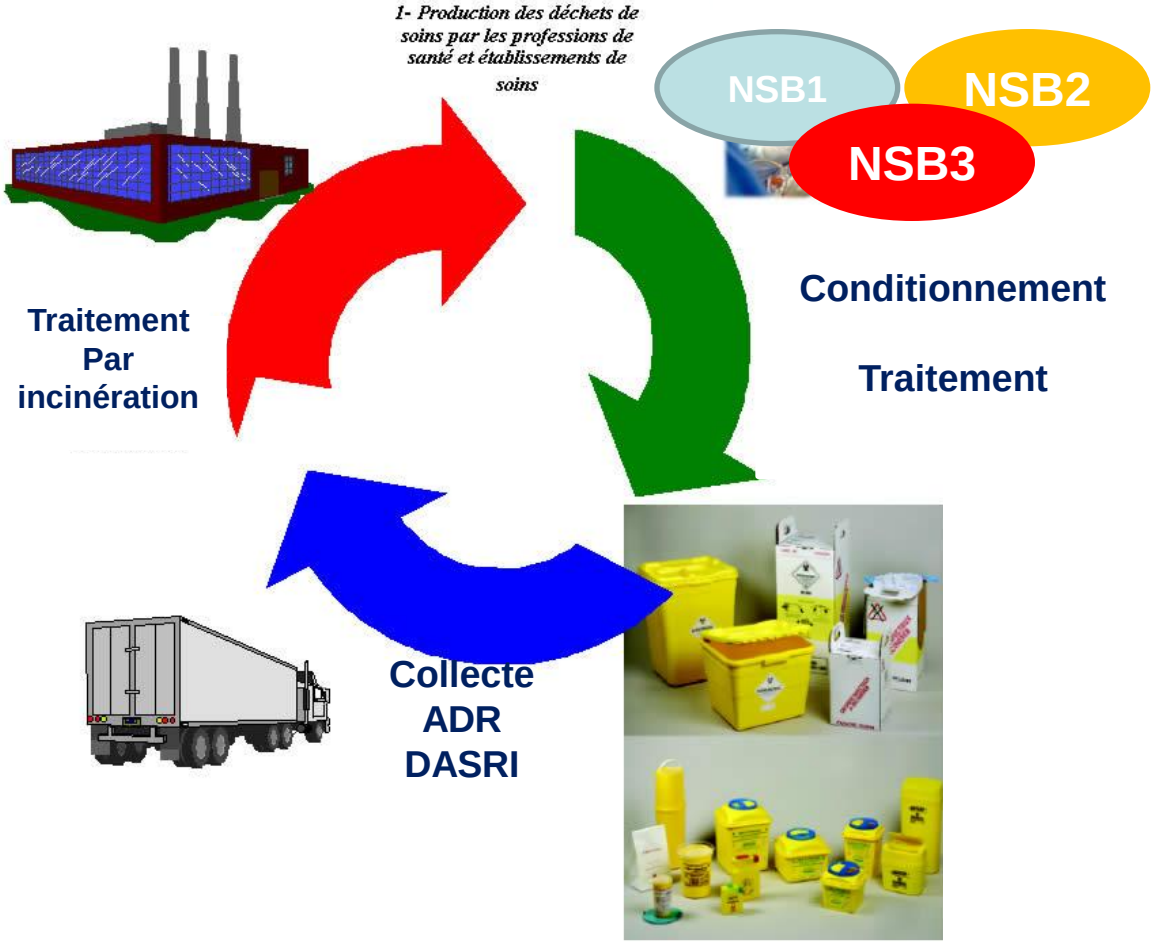
8. Gestion des déchets : les DASRI

Les emballages

Solide et/ou semi-liquide:
- **Matériel biologique : matrice alimentaire, organe, tissus, petit animal…**
- **Déchets de manipulation : gants, absorbant, boite de culture, cônes, tubes …**
- **EPI**

Coupant ou piquant:
- **Scalpel, lames …**
- **aiguilles, pipette en verre …**

Elimination - traitement



Les locaux – Désinfection

Les produits, ne pas confondre :

-Un **désinfectant** : testé en condition de propreté

-Un **détergeant** : testé en condition de saleté

Locaux – voie aérienne

Aérospet 100VF

ASEPTANIOS TERMINAL SPORE

Désinfection des surfaces des dispositifs médicaux préalablement nettoyés par voie aérienne (désinfection terminale).

COMPOSITION
Formaldéhyde, N-3-aminopropyl N-dodécylpropane 1,3-diamine éthanol.

PROPRIÉTÉS MICROBIOLOGIQUES
Bactéricide et levuricide : NF T 72-281
(8 ml/m³ - 30 min.)
Fongicide et sporicide : NF T 72-281 (8 ml/m³ - 120 min.)
Actif sur le virus HIV-1 : NF T 72-281.
(8 ml/m³ - 180 min.)

MODE D'EMPLOI
Produit prêt à l'emploi pour usage professionnel.
Utilisation hors présence humaine.
Temps de contact : de 30 à 180 minutes.
Ventiler la pièce efficacement avant récupération.

Aérospet 250VF

ASEPTANIOS HP50

Désinfection par voie aérienne des surfaces et des dispositifs médicaux préalablement nettoyés (désinfection terminale).

Composition :
Péroxyde d'hydrogène (50mg/g) et excipients.

Solution bactéricide (EN 1040, EN 1276, EN 13727, EN 13697), fongicide (EN 1275, EN 1650, EN 13697) et active sur BVDV (virus modèle HCV) et Herpès virus.

voie aérienne

NP30 TER SF ONE SHOT
Systéme de cartouche permettant de diffuser en continu, en aérosol le produit désinfectant.
Permet de traiter en désinfection aérienne des sas, locaux de petites tailles et véhicules de transport de 2 à 60 m3.

COMPOSITION: Aldéhyde glutarique, ammonium quaternaire, alcool isopropylique.
BACTERICIDE: NFT 72-151, NFT 72-281
FONGICIDE: NFT 72-201, NFT 72-281
VIRUCIDE: NFT 72-180 in vitro vs HIV, HBV, poliovirus.
SPORICIDE: NFT 72-281

Temps de contact préconisé: 2 heures, réutiliser le local après 6 heures.

2. Les mesures pratiques

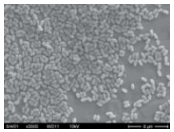
Qualification

Bandelettes

G. Stearothermophilus

10ᵉ6 à 10ᵉ3 spores

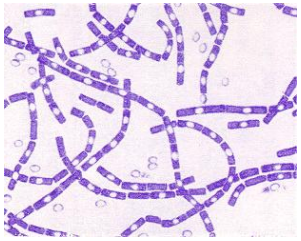
↓



Décontamination

↓

Mise en culture ⟶ **7 jours 56°C**



AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

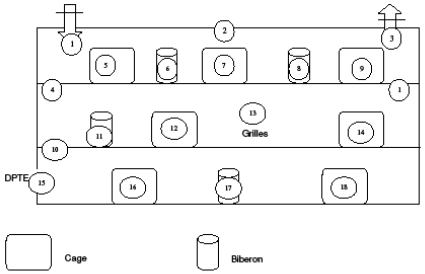
Fiche de suivi de bio-décontamination

Description de la décontaminée :
Date : 15/07/2009 — Manipulateurs : SA OLB
Bâtiment : J — Pièces : **module A3 – Isolateur souris**
Volume (m3) : 0.8
Appareil : --
Raison de la décontamination : qualification

Produit(s) utilisé(s) :
Nom commercial : NP30 TER SF
Dose utilisée : 1 bombe de 75 mL
Mode de contact : Brumisation
Temps de contact : 20h

Indicateurs Biologiques :
Nature du produit : ***B stearothermophilus*** — Charge : 10*3 spores/cupules

Plan de positionnement des IBs :



AFSSA Laboratoires Site de Maisons Alfort	Fiche Procédure A Animalerie I.01.13	Révision	00	1/2
		Date :	06/07/2009	

RESULTATS

Incubation le 16/07/2009 dans l'étuve de la salle d'expérimentation
Milieu de culture : 10 mL de BTS lot 09/ en tube à visse

Identification de l'indicateur biologique	Résultats de lecture							Résultat du GRAM pour les cultures positives (bacille gram positif OK)
	J+1	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7	
1	-			-	-	-	-	
2	-			-	-	-	-	
3	-			-	-	-	-	
4	-			-	-	-	-	
5	-			-	-	-	-	
6	-			+	+	+	+	OK
7	-			-	-	-	-	
8	-			+	+	+	+	OK
9	-			-	-	-	-	
10	-			-	-	-	-	
11	-			+	+	+	+	OK
12	-			-	-	-	-	
13	-			-	-	-	-	
14	-			-	-	-	-	
15	-			-	-	-	-	
16	-			-	-	-	-	
17	-			+	+	+	+	OK
18	-			-	-	-	-	
Témoin pos.	+			+	+	+	+	OK
Témoin nég.	-			-	-	-	-	
Date	17/07			20/07	21/07	22/07	23/07	

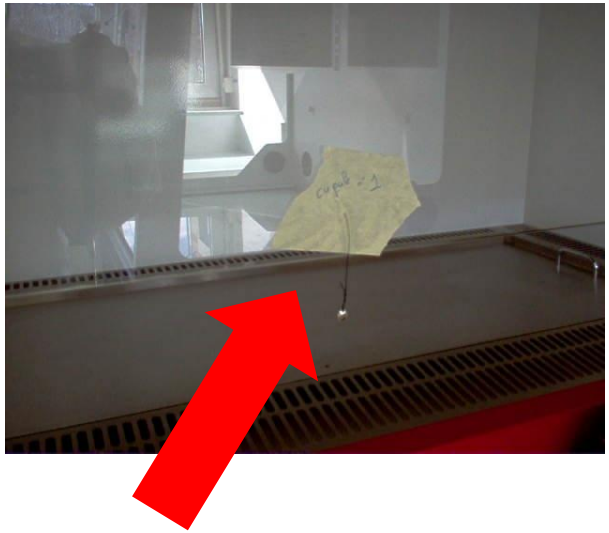
Conclusion :
Décontamination qualifiée pour les isolateurs souris avec 1 bombe de NP30 TER SF de 75 mL

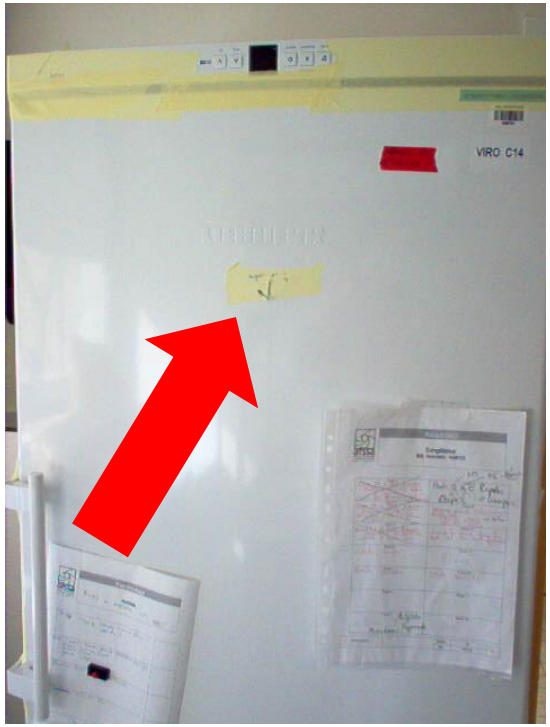
Pas de décontamination à l'intérieur des biberons

Date : 27/09/2009 VISA :

AFSSA Laboratoires Site de Maisons Alfort	Fiche Procédure A Animalerie I.01.13	Révision	00	2/2
		Date :	06/07/2009	

Qualification
Mise en place des cupules





Décontamination

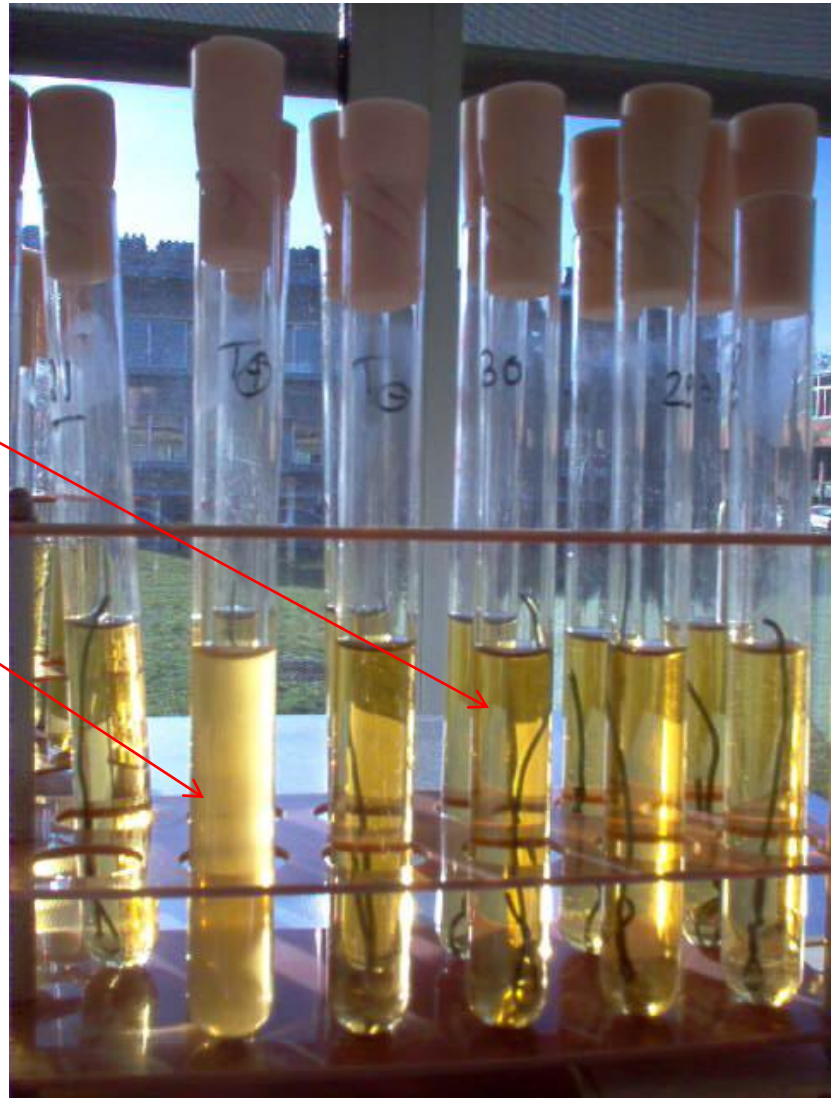
Culture des cupules

56-60°C

Résultat

Témoin -

Témoin +



Certificat

Site de Maisons-Alfort

LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHE EN PATHOLOGIE ANIMALES ET ZOONOSES (LERPAZ)

ATTESTATION DE DECONTAMINATION N°2010-AFSSA LERPAZ - FA01

Nous,

Pascal BOIREAU, Directeur du Laboratoire ;
Sébastien ALLIX, Officier de Biorisque;
Labib BAKKALI, Responsable de l'équipe Fièvre Aphteuse de l'UMR Virologie ;

Certifions que le laboratoire de « Fièvre aphteuse » de l'UMR de Virologie localisé dans le bâtiment E et les postes de sécurité microbiologique à l'intérieur du laboratoire ont été décontaminés par voie aérienne (brumisation) à l'aide d'un désinfectant à base de formaldéhyde, de glutaraldéhyde et d'éthanol.

Le produit utilisé est l'Aseptanios Terminal Spore (référence 0117.034 – Laboratoire Anios) à la concentration de 8mL/m³. Ce désinfectant a été utilisé en recirculation d'air dans le laboratoire :

Date	N° lot Aseptanios Terminal Spore	N°série AEROPEST	Volume traité/appareil	Temps de contact
25/02/2010	910B	M00702UA	150m³	17h30 du 25/02/10 17h au 26/02/10 10h30
	A1V1897	M00702UA	150m³	
	685B	M00702UA	150m³	
	A2V1013	M00702UA	150m³	
	A2V1404	K34058VA	150m³	
	A1V2376	K34058VA	150m³	

Le réarmement des CTA et des extracteurs ont été opérés après la décontamination le 26/02/2010 à partir de 10h30 pour le renouvellement de l'air dans ce laboratoire.

Fait en 1 exemplaire à Maisons-Alfort, le 04/03/2010

Pascal BOIREAU Sébastien ALLIX Labib BAKKALI

23 avenue du Général de Gaulle
94706
Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 00
Fax 01 1977 13 44
www.afssa.fr

Certificat de décontamination n°2010- AFSSA LERPAZ-FA01
Suivi de la remise aux entreprises

Date de remise	Entreprise	Cacher ou Visa entreprise	Visa AFSSA

9. Equipement et matériels

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

Critères de performance : NF 12469

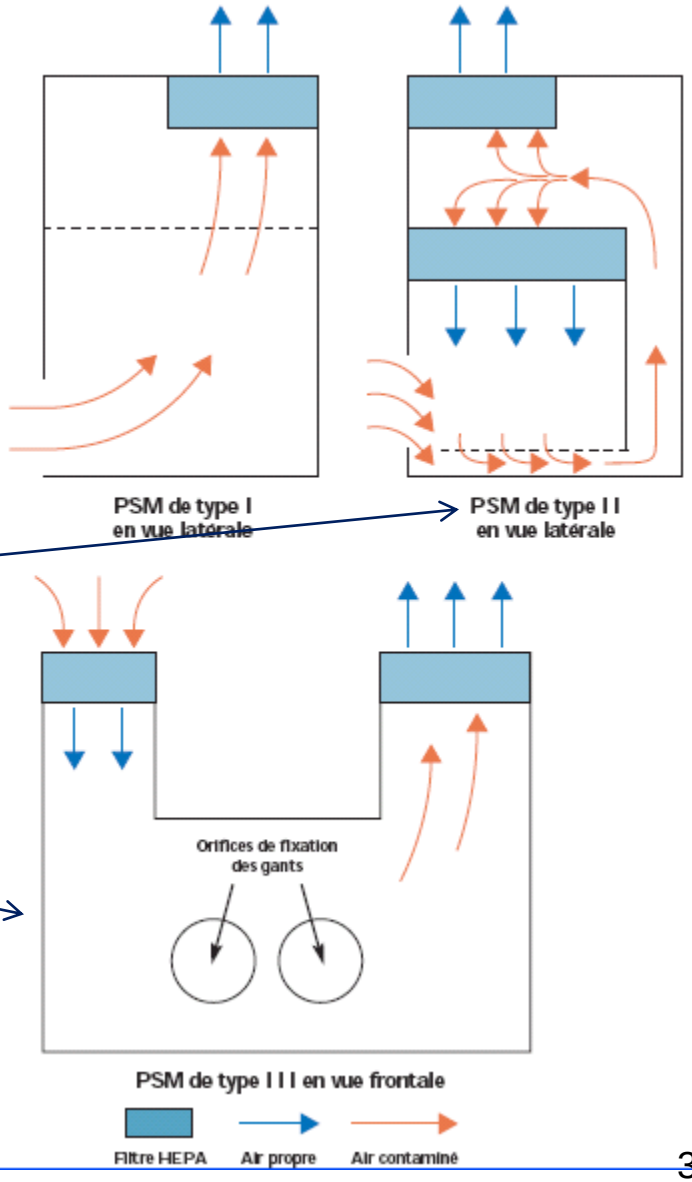
PSM de type 1

PSM de type 2a

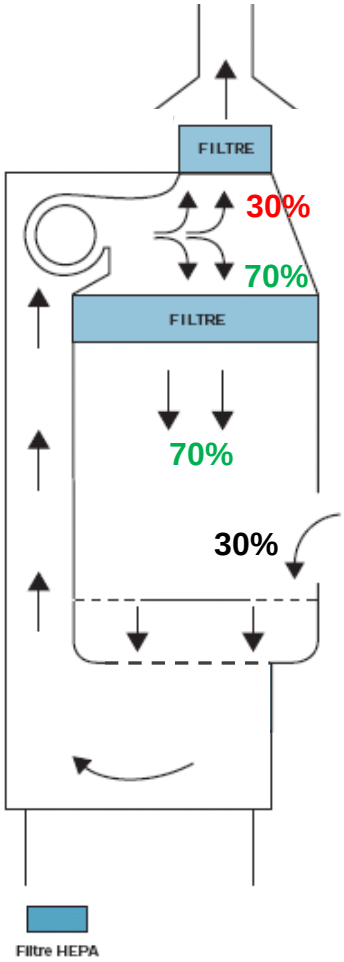
PSM de type 2b

PSM de type 3

≠ Isolateur = boite à gants

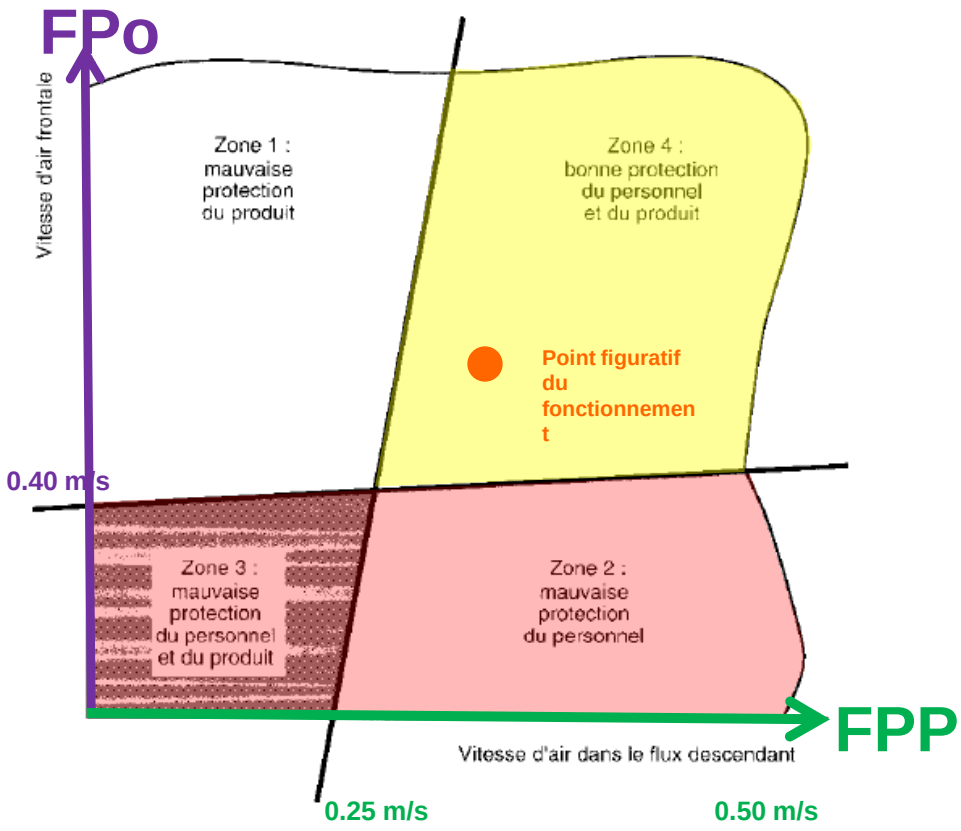


PSM de type 2 : comprendre son fonctionnement

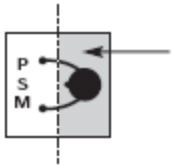


Flux laminaire = « laminartié » = Facteur de Protection du Produit : FPP

Flux d'air entrant = Facteur de Protection du Personnel : FPo



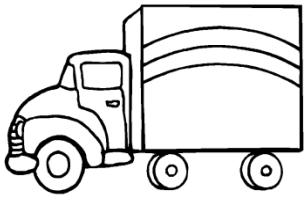
PSM de type 2 : Positionnement



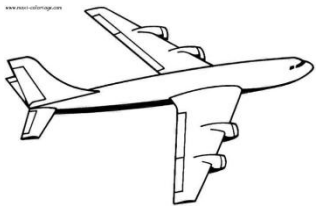
Zone de protection du PSM = surface dans laquelle l'écoulement ne doit pas être perturbé par une personne autre que l'opérateur

Entre la face frontale du PSM et :		Entre l'extrémité du PSM et :
une voie de circulation habituelle 1 m P S M Voie de passage	la face frontale d'un autre PSM 3 m P S M P S M	un mur ou un autre obstacle perpendiculaire au PSM P S M 0,3 m
une paillasse parallèle au PSM utilisé par le même opérateur 1,5 m P S M Paillasse	une porte dans un mur perpendiculaire au PSM 1,5 m P S M Mur	une colonne placée en avant de la face frontale du PSM Pilier 0,3 m P S M
un mur opposé (ou un autre obstacle à l'écoulement de l'air) 2 m P S M	un diffuseur d'air de compensation n'appartenant pas au type " basse vitesse " 1,5 m P S M Diffuseur d'air	une porte dans un mur parallèle au PSM P S M Mur 1 m

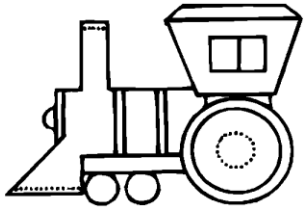
3. Transport



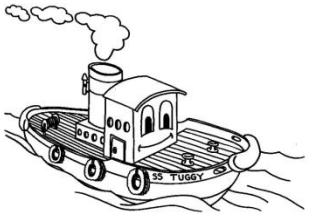
Route : règlements <u>ADR</u> . Arrêté du 1er juin 2001 relatif au *transport des marchandises dangereuses par route* modifie par l'arrête du 05/12/2002



Aérien : règlements <u>IATA</u> (Association du Transport Aérien Internationale) et <u>OACI</u> (Organisation de l'Aviation Civile Internationale)



Poste : le *Manuel de la poste aux lettres publié par* <u>l'Union Postale Universelle (UPU)</u> reflète les recommandations des Nations Unies en utilisant les dispositions de l'OACI comme base pour les expéditions



Rail : règlement RID (international) et <u>directive 96/49/EC</u> (Europe, Moyen-Orient, Afrique du Nord)

Mer : *<u>Code maritime international</u> des marchandises dangereuses publié par l'Organisation maritime internationale* (OMI)

Classification des matières infectieuses selon l'ONU

Catégorie A - matière infectieuse représentant un risque pour l'homme et l'animal : peut provoquer, lorsqu'une exposition se produit, une invalidité permanente ou une maladie potentiellement mortelle.

Exemple : les cultures (souches de laboratoire) d'agents pathogènes

- **UN2814 : risque de maladie chez l'homme et l'animal**
- **UN2900 : risque de maladie chez l'animal exclusivement**

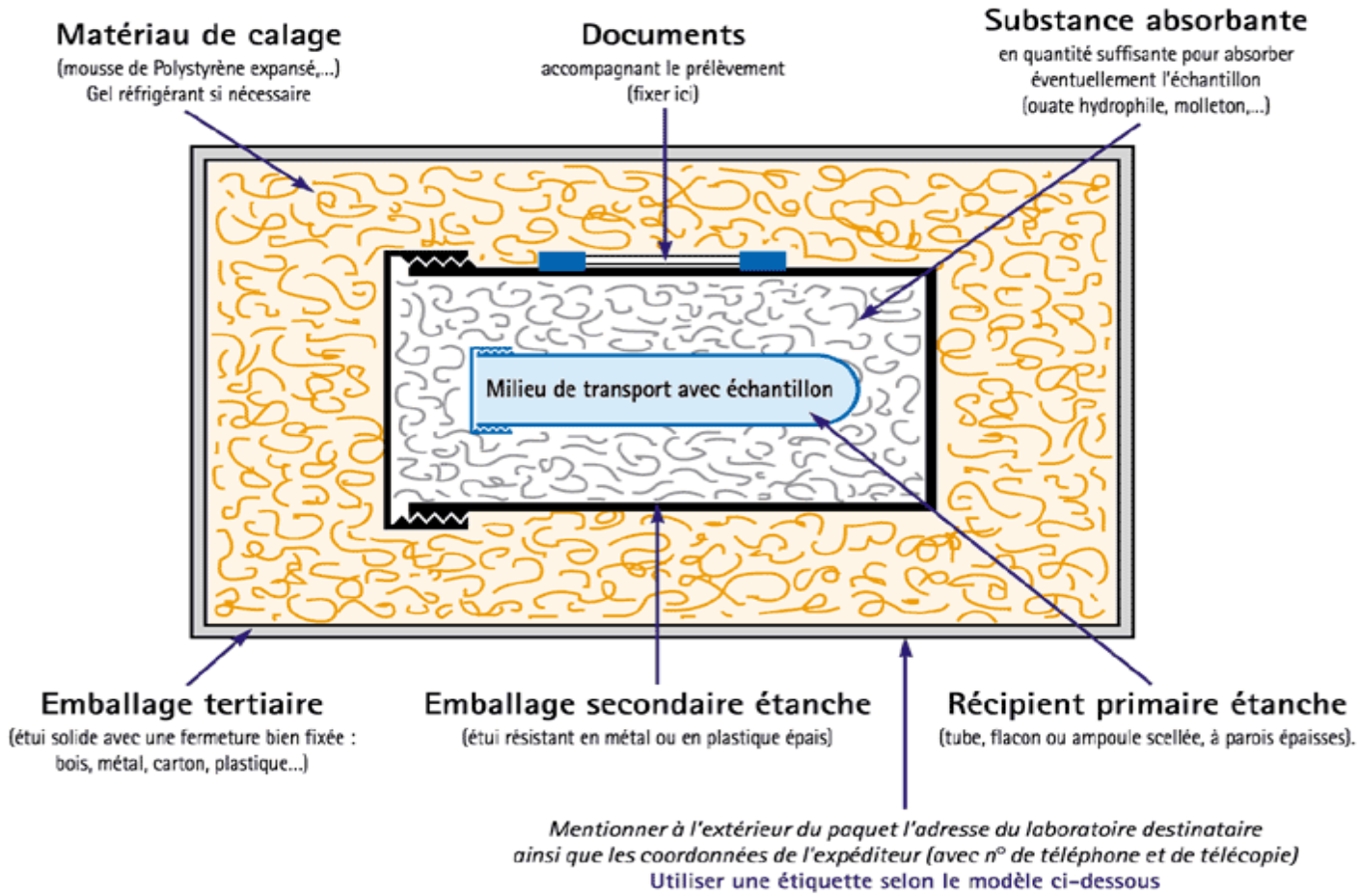
Catégorie B - matière infectieuse n'entrant pas dans la catégorie A

- **UN3373 : matière biologique catégorie B**

Exemple : échantillon de diagnostic ou échantillon clinique

Triple Emballage : principe

Schéma simplifié d'un triple emballage
(selon normes de la classe 6.2. de l'O.N.U.)



Triple Emballage : application

P620/P602
Catégorie A

≠

P650
Catégorie B

4. Evaluation des risques selon EUFMD

Où		Quoi		Combien		Vers où	
5	Pièce pour animaux, contenant des porcs infectés	5	Personne potentiellement contaminée, sans prendre de douche	5	Inconnue ou très élevée ou longtemps : > 1 l ou Kg de fluide ou matière / jour. > 10 jours, d'air > 50 personnes	5	Extérieur du confinement, exposition probable d'animaux sensibles
4	Pièce pour animaux contenant des animaux infectés (pas les porcs)	4	Déchets potentiellement contaminés	4	Elevée : 10 – 100 ml ou gramme de fluide ou matière / jour. 1 – 10 jours fuite d'air 5 – 50 personnes	4	Extérieur du confinement, enclos ou ferme avec des animaux sensibles. Contact avec d'autres (pas FA) animaux sensibles de niveau 3 et 4 de Bios. Vét.
3	Lab. qui entreprend des travaux sur la FA Ou Pendant la première moitié du processus de désinfection par le formaldéhyde ou cycle d'autoclavage à la vapeur ou stérilisation à l'oxyde d'éthylène	3	Air potentiellement contaminé. Ou Personne potentiellement contaminée, après la douche	3	Modérée : 1 – 10 ml ou gramme de fluide ou matière / jour. 1 – 24 heures fuite d'air. 2 – 5 personnes	3	Extérieur du confinement, animaux non sensibles à FA
2	Lab ne manipulant pas le virus FA mais dans le même bâtiment / confinement des labs manipulant le virus FA Ou Pendant la deuxième moitié du processus de désinfection par le formaldéhyde ou cycle d'autoclave à la vapeur ou stérilisations à l'oxyde d'éthylène	2	Fluide potentiellement contaminé.	2	Faible : < 1 ml ou gramme de fluide ou matière / jour. < 1 heure, fuite d'air. 1 personne.	2	Extérieur de la pièce à haut confinement mais sur le terrain de l'institut
1	Dans la zone de maintenance d'ingénierie – remplacement filtre HEPA, etc.	1	D'autres éléments potentiellement contaminés	1	Très faible : << 1 ml ou gramme de fluide ou matière / jour. << 1 heure, fuite d'air.	1	Dans la zone de maintenance d'ingénierie – remplacement filtre HEPA etc.

Risque relatif = Où x Quoi x Combien x Vers où

4. Evaluation des risques selon EUFMD

Risque relatif = Où x Quoi x Combien x Vers où

≤ 20 est « Acceptable »	21 – 60 est « Faible »	61 – 250 est « Considérable »	> 250 est « Catastrophique »
Signaler à l'agent du biorisque	Signaler à l'agent de biorisque **Signaler au comité de biorisque** **Signaler au Directeur Général**	Signaler à l'agent de biorisque Signaler au comité de biorisque Signaler au Directeur Général **Réunir, en même temps, une cellule de crise.** **Décision sur la nécessité d'informer les autorités**	Signaler à l'agent de biorisque Signaler au comité de biorisque Signaler au Directeur Général Réunir, en même temps, une cellule de crise. **Signaler aux autorités réglementaires et Chef du service vétérinaire**

anses
alimentation, environnement, travail

ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE :

La biosécurité au laboratoire manipulant le FMDV vivant

Merci de votre attention

n° lot. F090202L

Reçu le 29/07/09

KG

PrioCHECK® FMDV NS

Test ELISA pour la détection in vitro des anticorps spécifiques de la Fièvre aphteuse dans le sérum du bétail, des moutons, des chèvres et des porcs

Notice d'utilisation

Coffret de 5 plaques pour 450 échantillons
©Prionics AG

Version 1.0_f

Pour diagnostic *in vitro* uniquement
Usage strictement vétérinaire
Stocker à 5±3°C
Produit No.: 7610440

Introduction

La fièvre aphteuse constitue la menace économique la plus importante pour l'industrie animale. Cette maladie très contagieuse peut toucher une grande partie des élevages et elle est très répandue dans le monde. Le virus de la fièvre aphteuse comporte 7 sérotypes distincts, ce qui rend assez complexe le diagnostic avec les méthodes sérologiques classiques. Pour contrôler les épidémies qui pourraient se déclarer dans le futur, une vaccination d'urgence va être mise en place. Le vaccin est (en partie) constitué de protéines structurales du virus de la fièvre aphteuse. Les animaux vaccinés ne produisent donc que des anticorps dirigés contre les protéines structurales du virus. En revanche, l'infection naturelle par le virus de la fièvre aphteuse entraîne la synthèse d'anticorps dirigés contre les protéines structurales mais aussi contre les protéines non structurales du virus. Ainsi, un ELISA détectant les anticorps dirigés contre les protéines non structurales du virus de la fièvre aphteuse pourra dépister les animaux infectés par le virus, mais il permettra aussi de faire la distinction entre les animaux infectés et les animaux vaccinés.
PrioCHECK® FMDV NS détecte les anticorps dirigés contre la protéine non structurale 3 ABC du virus de la fièvre aphteuse. Le test détecte les animaux infectés par le virus de la fièvre aphteuse, indépendamment du sérotype responsable de l'infection ou du statut vaccinal de l'animal. Il peut être utilisé pour tester le bétail, les moutons, les chèvres et les porcs.

Principe du test

PrioCHECK® FMDV NS est un ELISA de type bloquant. Les plaques sensibilisées avec un anticorps monoclonal spécifique 3ABC sont incubées avec la protéine 3ABC. L'antigène NS du virus va alors se lier à l'anticorps monoclonal fixé sur les plaques.
Les échantillons de sérum sont ensuite distribués sur la plaque. Après incubation, la plaque est lavée et le conjugué ajouté. Les anticorps dirigés contre les protéines non structurales (NS) du virus de la fièvre aphteuse, s'ils sont présents dans l'échantillon, vont se lier à la protéine 3ABC et bloquer la liaison de l'anticorps monoclonal marqué à la peroxydase. La plaque est incubée et lavée, le substrat chromogène (TMB) prêt à l'emploi est ensuite distribué et la plaque est incubée à T° ambiante (22±3°C). A la fin de la période d'incubation, le développement de la coloration est stoppé et la densité optique (DO) est mesurée à 450 nm afin de mettre en évidence la présence d'anticorps spécifiques de la fièvre aphteuse.
Le test PrioCHECK® FMDV NS est réalisé en effectuant une seule dilution puisque les sérums sont dilués au 1/5 avant d'être testés.

Composition du coffret

Le coffret PrioCHECK® FMDV NS, s'il n'est pas utilisé immédiatement, peut être stocké à 5±3°C jusqu'à la date de péremption
Qui figure sur l'étiquette du coffret. La durée de conservation des produits du coffret une fois dilués, ouverts ou reconstitués, est mentionnée au chapitre s'y référant (voir ci-dessous). Les informations sur les risques chimiques sont données dans le paragraphe «Consignes de Sécurité et Phrases de Risque et de Sécurité» (Annexe II).

Composant 1
Plaque de microtitration
Cinq plaques de microtitration conditionnées sous vide partiel dans des sachets contenant un déshydratant.

Composant 2
Conjugué (30x)
Un flacon contenant 2,5 ml de conjugué
Le conjugué dilué n'est pas stable, à préparer juste avant utilisation.

Composant 3
Tampon de dilution (2x)
(concentré 2x, à diluer avant utilisation). Un flacon contenant 60 ml de tampon de dilution.
Conservation du tampon de dilution (1X): 24 heures à 5±3°C.

Composant 4
Additif (lyophilisé)
(Reconstituer avant utilisation).
Cinq flacons contenant 2,5 ml d'additif lyophilisé.
Conservation de l'additif reconstitué: jusqu'à la date de péremption à -20°C.

Composant 5
Eau déminéralisée
Un flacon contenant 10 ml d'eau déminéralisée.

Composant 6
Liquide de lavage (200x)
(concentré 200x, à diluer avant utilisation). Un flacon contient 60 ml de liquide de lavage.
Conservation de la solution (1X): 1 semaine à 22±3°C.

Composant 7
Contrôle positif (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 0,6 ml de contrôle positif.

Composant 8
Contrôle positif faible (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 0,6 ml de contrôle positif faible.

Composant 9
Contrôle négatif (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 0,6 ml de contrôle négatif.

Composant 10
Substrat chromogène (TMB) (prêt à l'emploi)
Un flacon contenant 60 ml de substrat chromogène (TMB).

Composant 11
Solution d'arrêt (prête à l'emploi)
Un flacon contenant 60 ml de solution d'arrêt.

Autres composants du coffret :
- Notice d'utilisation
- 10 films adhésifs pour couvrir les plaques
- Certificat d'analyse

Equipement nécessaire mais non fourni

Equipement général:
Equipement de laboratoire aux normes de sécurité nationales.

Analyse des résultats:
Lecteur de microplaques: Multiscan EX ou équivalent.
Le lecteur doit être équipé d'un filtre permettant de lire les plaques à 450 nm.

Equipement optionnel:
Laveur de microplaques: Tecan EIA Tray Washer ou équivalent.

Mode opératoire

Précautions
Les recommandations nationales concernant la manipulation d'échantillons animaux doivent être appliquées de façon stricte. Le test PrioCHECK® FMDV NS ne doit être réalisé que dans les laboratoires équipés pour cela.
Les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Tout matériel en contact avec ces échantillons doit être considéré comme potentiellement contaminé.

Les informations sur les risques chimiques sont données au paragraphe «Consignes de sécurité et Phrases de Risque et de Sécurité» (Annexe II).

Remarques
Pour obtenir des résultats optimums avec PrioCHECK® FMDV NS, les précautions suivantes doivent être prises :
- **Le mode opératoire doit être rigoureusement suivi.**
- Tous les réactifs du coffret doivent être ramenés à T° ambiante (22±3°C) avant utilisation.
- L'embout des pipettes doit être changé à chaque fois qu'un nouvel échantillon ou réactif est prélevé.
- Des réservoirs séparés doivent être utilisés pour chaque réactif.
- Les composants du coffret ne doivent pas être utilisés après la date de péremption ou si un changement dans leur aspect est observé.
- Les réactifs provenant de coffrets portant des numéros de lots différents, ne doivent pas être associés dans une même série de tests.
- Le test doit être réalisé avec de l'eau déminéralisée ou une eau équivalente.

SOLUTIONS A PREPARER A L'AVANCE

Tampon de dilution 1X
Diluer le tampon de dilution (Composant 3) concentré 1:1 dans de l'eau déminéralisée. Pour une plaque : préparer 24 ml (12 ml de tampon concentré et 12 ml d'eau déminéralisée)
Peut-être conservé à 5±3°C pendant de 24 heures

Additif
Ramener le flacon d'additif (Composant 4) lyophilisé à T° ambiante et le reconstituer[1] avec de l'eau déminéralisée fournie dans le kit (volume à ajouter : voir l'étiquette du flacon). Doit être conservé à -20°C jusqu'à la péremption.

Tampon ELISA
Diluer l'additif reconstitué dans le tampon de dilution pour obtenir une concentration finale de 10% (v/v). Pour une plaque : préparer 24 ml (2,4 ml d'additif et 21,6 ml de tampon de dilution). Conserver le tampon ELISA non utilisé à 5±3°C pendant 24 heures

Conjugué
Préparer la dilution de travail du conjugué (Composant 2) en diluant le conjugué dans le tampon ELISA. Pour 1 barrette: préparer 12 ml de conjugué dilué (ajouter 400 µl de conjugué (30x) à 11.6 ml de tampon ELISA)

---

[1] Les réactifs lyophilisés doivent être reconstitués de la manière suivante
- Ramener les flacons à 22±3°C
- Tenir le flacon verticalement et le tapoter contre le plan de travail pour s'assurer que tout le contenu du flacon se trouve au fond du flacon
- Ouvrir le flacon soigneusement
- Ajouter la quantité d'eau déminéralisée (Composant 5) spécifiée
- Reboucher le flacon et laisser le lyophilisat se dissoudre
- Agiter doucement le flacon jusqu'à dissolution complète du lyophilisat
- Laisser le flacon reposer au moins 15 minutes à 22±3°C avant utilisation
- Agiter de temps en temps le flacon par retournement (en évitant la formation de mousse)

PrioCHECK® FMDV NS

Note: Le conjugué dilué doit être prepare juste avant utilisation.

Liquide de lavage
Diluer le liquide de lavage (concentré 200x) (Composant 6) dans l'eau déminéralisée (voir l'étiquette du flacon). La quantité de liquide de lavage fournie est suffisante pour préparer un volume final de 12 litres. Stabilité du liquide de lavage dilué: 1 semaine à 22±3°C.

Remarque: Les lavages peuvent être effectués avec un laveur automatique ELISA. Si l'on ne dispose pas de laveur automatique, le lavage des plaques peut être fait manuellement avec au minimum 200 µl de liquide de lavage par puits. Puis vider la plaque et répéter le lavage autant de fois que spécifié. Il n'est pas nécessaire d'égoutter les plaques sur du papier absorbant entre les lavages. Tapoter fermement les plaques après le dernier cycle de lavage.

JOUR 1

INCUBATION DES SERUMS

1.1 Distribuer 80 µl de tampon ELISA dans tous les puits (Composant 1)
1.2 Déposer 20 µl de contrôle négatif (Composant 9) dans les puits A1 et B1
1.3 Déposer 20 µl de contrôle positif faible (Composant 8) dans les puits C1 and D1
1.4 Déposer 20 µl de contrôle positif (Composant 7) dans les puits E1 and F1.
1.5 Déposer 20 µl d'échantillon dans les autres puits
1.6 Couvrir les plaques avec un film adhésif fourni dans le coffret
1.7 Agiter doucement les plaques.
1.8 Incuber toute la nuit (16–18 heures) à 22±3°C.

JOUR 2

INCUBATION AVEC LE CONJUGUE

2.1 Vider les plaques après incubation et laver 6 fois avec 200 à 300 µl le liquide de lavage. Les tapoter fermement sur du papier absorbant après le dernier cycle de lavage.
2.2 Distribuer 100 µl de solution de travail du conjugué dans tous les puits.
2.3 Couvrir les plaques à l'aide des films adhésifs fournis dans le coffret.
2.4 Incuber 60±5 minutes à 22±3°C.

INCUBATION AVEC LE SUBSTRAT CHROMOGENE

3.1 Vider les plaques après incubation et laver 6 fois avec 200 à 300 µl le liquide de lavage. Les tapoter fermement sur du papier absorbant après le dernier cycle de lavage.
3.2 Distribuer 100 µl de substrat chromogène (TMB) dans tous les puits.
3.3 Incuber 20 minutes à 22±3°C.
3.4 Distribuer 100 µl de solution d'arrêt (Composant 11) dans tous les puits.
3.5 Homogénéiser le contenu des plaques avant de mesurer la densité optique (DO).

Remarque : Commencer à ajouter la solution d'arrêt 20 minutes après avoir déposé la solution de substrat chromogène (TMB) dans le premier puits. Distribuer la solution d'arrêt dans tous les puits en gardant le même ordre et le même rythme que pour distribuer le substrat chromogène (TMB).

LECTURE DU TEST ET CALCUL DES RESULTATS

4.1 Mesurer la densité optique (DO) des puits à 450 nm dans les 15 minutes suivant l'addition de la solution d'arrêt.
4.2 Calculer la DO_{450} moyenne des puits A1 and B1 (contrôle négatif = DO_{450} max).
4.3 Le pourcentage d'inhibition (PI) des sérums de contrôle et des échantillons est calculé selon la formule ci-dessous.

La DO_{450} des échantillons est exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) par rapport à la DO_{450} max.

$$PI = 100 - \left[\frac{DO_{450} \text{ de l'échantillon}}{DO_{450} \text{ max}} \right] \times 100$$

INTERPRETATION DES RESULTATS

Validation des critères
5.1 La DO_{450} max (DO_{450} moyenne du contrôle négatif) doit être > 1.000.
5.2 Le pourcentage d'inhibition du contrôle positif faible doit être > 50%.
5.3 Le pourcentage d'inhibition du contrôle positif doit être > 70%.
5.4 Si ces critères ne sont pas validés, les résultats de la série de tests sont ininterprétables.

Remarque: Si la DO_{450} d'un échantillon est supérieure à la D_{450} max, le pourcentage d'inhibition peut être considéré comme étant égal à 0%. Si la DO_{450} moyenne du contrôle négatif (DO450 $_{450}$ max) est inférieure à 1,000, la solution de substrat chromogène (TMB) était peut-être trop froide au moment de son utilisation. Dans ce cas, penser à ramener la solution de substrat à 22±3°C avant utilisation ou incuber les plaques plus longtemps (sans dépasser 30 minutes d'incubation). Si la DO_{450} moyenne du contrôle négatif (DO_{450} max) est supérieure à 2,000, il est conseillé de diminuer le temps d'incubation avec le substrat chromogène (TMB).

Interprétation du pourcentage d'inhibition

PI = < 50% Négatif
Absence d'anticorps spécifiques de la protéine NS du virus de la fièvre aphteuse dans le prélèvement.

PI = ≥ 50% Positif
Présence d'anticorps spécifiques de la protéine NS du virus de la fièvre aphteuse dans le prélèvement.

Annexe I

Avertissement
Les informations contenues dans cette notice sont considérées comme complètes et exactes au moment de leur publication. Prionics AG ne peut en aucun cas être tenu pour responsable des dommages fortuits ou indirects liés à l'utilisation de ce document ou en résultant.

Responsabilité
Prionics AG garantit que ses produits sont conformes aux caractéristiques décrites sous réserve qu'ils soient utilisés selon les instructions fournies et dans les délais de conservation indiqués. Prionics AG exclut toute autre garantie, explicite ou implicite, y compris la garantie d'aptitude à la vente ou de conformité pour une utilisation particulière. La garantie mentionnée ici, ainsi que les informations, spécifications et descriptions des produits commercialisés par Prionics AG figurant dans les catalogues Prionics AG ou tout autre document, ne peuvent pas être modifiées, sauf consentement écrit express de Prionics AG. Les présentations orales ou écrites, ou les publications non conformes à cette garantie ne sont pas autorisées et sont sujettes à caution.
En cas de rupture de la garantie, l'obligation de Prionics AG se limite à la réparation ou à l'échange, à sa discrétion, du produit ou d'une partie du produit, sous réserve que le client informe rapidement Prionics AG de cette rupture de garantie. Au cas où la société Prionics AG ne pourrait pas réparer ou remplacer le produit ou une partie du produit, elle devra rembourser au client l'intégralité des sommes perçues pour ce produit ou pour partie de ce produit.

Prionics AG ne peut être tenu pour responsable des dommages fortuits, particuliers ou indirects y compris ceux résultant d'une perte économique ou d'un dommage matériel subis par un client suite à l'utilisation de ses produits.

Prionics AG et Prionics Lelystad BV sont des entreprises certifiées ISO 9001:2000.

Annexe II

Normes de Sécurité et Phrases de Risque et de Sécurité

1. Les Normes de Sécurité Nationales doivent être appliquées de façon stricte.

2. Phrases de Risque et de Sécurité

Composant 1
Plaque de microtitration
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 2
Conjugué
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 3
Tampon de dilution (2x)
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 4
Additif (lyophilisé)
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 5
Eau déminéralisée
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 6
Liquide de lavage (200x)
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 7
Contrôle positif (prêt à l'emploi)
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 8
Contrôle positif faible (prêt à l'emploi)
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 9
Contrôle négatif (prêt à l'emploi)
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 10
Substrat chromogène (TMB) (prêt à l'emploi)
Code de risque: Ce produit n'est pas classé selon les normes de l'Union Européenne.

Composant 11
Solution d'arrêt (prête à l'emploi)
Code de risque:
R35: Provoque de graves brûlures.
S26: En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter rapidement un médecin.
S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.
S45: En cas d'accident ou de malaise, consulter rapidement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible).

Annexe III

Références bibliographiques

1) Sørensen K.J., Madsen K.G., Madsen E.S., Salt J.S., Ngindi J., Mackay D.K.J.
Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus.
Arch Virol (1998) 143: 1461-1476.

Contacts

Prionics Lelystad B.V.
Platinastraat 33
P.O. Box 2271
NL-8203 AG, Lelystad
The Netherlands
Tel. +31 320 714000
Fax +31 320 714029

Prionics AG
Wagistrasse 27a
CH-8952 Schlieren-Zurich
Switzerland
Tel. +41 44 200 2000
Fax +41 44 200 2010
www.prionics.com
info@prionics.com

Pour obtenir des informations sur notre réseau de distribution, consulter le site www.prionics.com

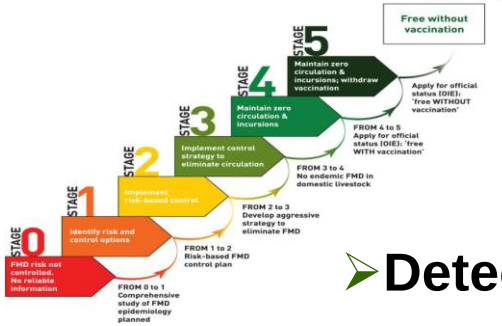
L'ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE DE DIAGNOSTIC

ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE

21 mai 2012

Labib BAKKALI KASSIMI
Labib.bakkali-kassimi@anses.fr
Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort

Lutte contre la fièvre aphteuse



- Detecter et confirmer les foyers
- Investiguer les foyers (source, propagation, sérotype..)
- Estimer l'incidence de la maladie
- Estimer la couverture vaccinale et son efficacité
- Surveillance dans le pays et des importation

DIAGNOSTIC DE LABORATOIR DE BONNE QUALITE

Rôle du diagnostic de laboratoire

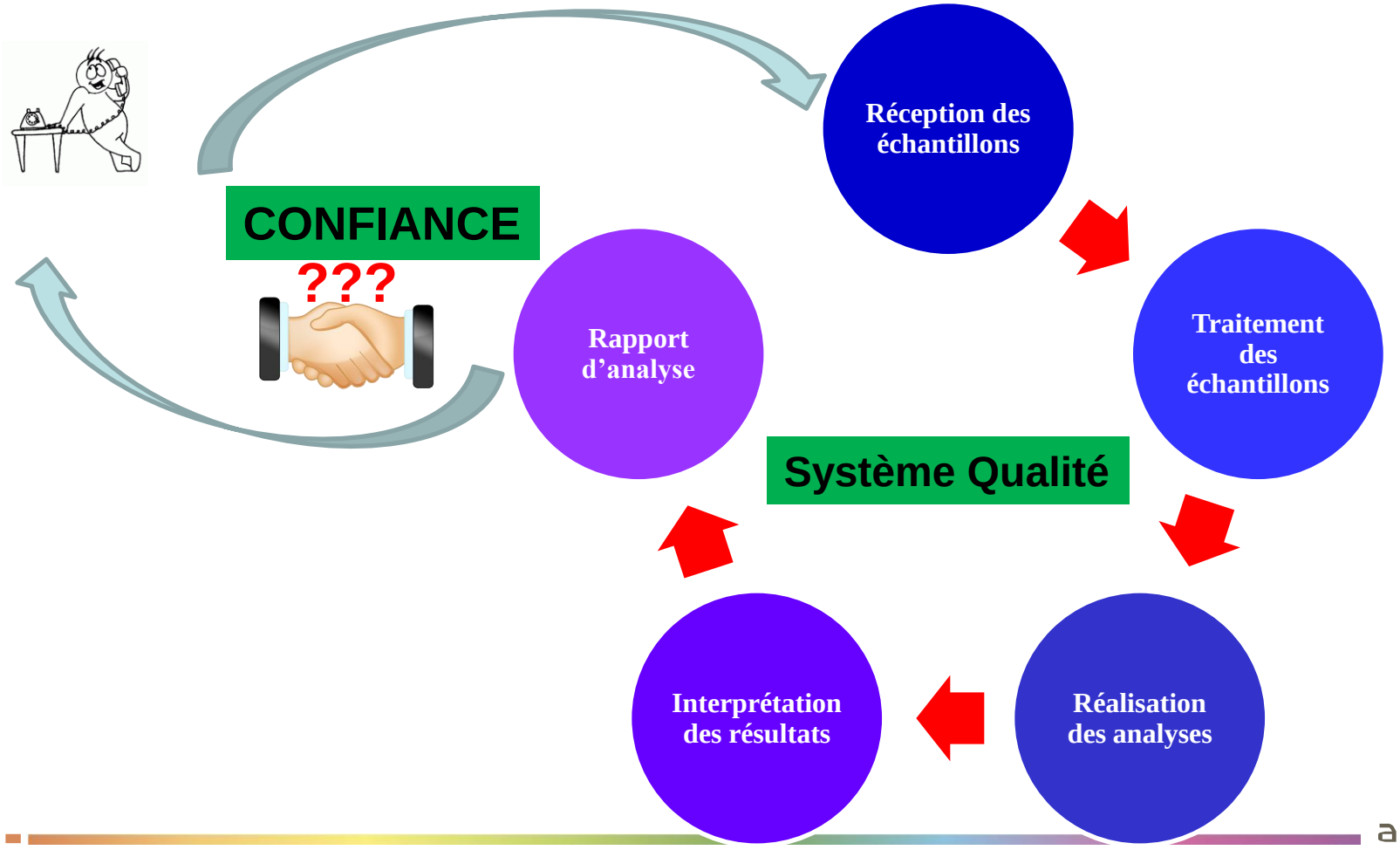
- Appui le programme de surveillance
- Appui, complémente et confirme le diagnostic clinique
- **Nécessite des information épidémiologiques complètes sur les échantillons soumis pour une interprétation rationnelle des résultats**
- **La qualité du diagnostic dépend du bon choix du prélèvement et la qualité des échantillons**

Conséquences d'un diagnostic de mauvaise qualité

- Actions inappropriées
  - investigation démesurée
  - traitement démesuré
  - Mauvais traitement
- Inaction inapproprié
  - Absence d'investigation
  - Pas de traitement
- Retard dans l'action
- Perte de crédibilité du laboratoire

Diagnostic de bon qualité ?

= fournir un résultat précis, fiable, correctement interprété et dans le temps imparti



ISO 17025

ACCREDITED LABORATORY

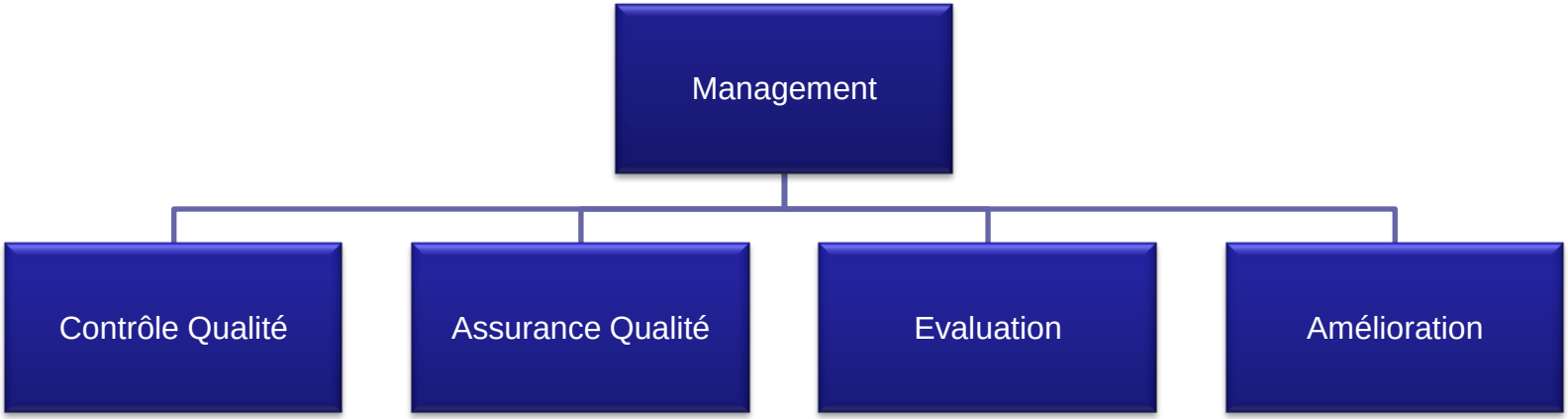
Exigences Générales Concernant la Compétence des Laboratoires d'Etalonnages et d'Essais

anses

SYSTÈME QUALITE

<u>Objectif</u>: assurer la fiabilité et la précision du diagnostic

Composantes du système qualité:



Définitions

Management de la Qualité

- Activités coordonnées permettant d'orienter et de contrôler un organisme en matière de qualité.

Assurance Qualité

- Ensemble du programme qui garantie que le résultat final rapporté est correcte.

Contrôle Qualité

- Les mesures qui doivent êtres incluses dans chaque essai pour vérifier la validité du test (Contrôle Qualité Interne).

Evaluation

Moyen pour évaluer la qualité des résultats rendus par le laboratoire.

- **Audit interne et externe**
- **Essai Interlaboratoires d'Aptitude (EILA)**

Amélioration

Approche formelle de l'analyse des performances et la mise en place systématique d'actions pour les améliorer.

- **Relevé des anomalies et mis en place des actions correctives**
- **Plans d'actions suite à l'évaluation**

Assurance Qualité

Variables qui affectent la qualité des résultats

PERSONNEL:
Éducation, formation, aptitude, compétence, engagement, nombre, encadrement, motivation

ECHANTILLONS:
- Type
- Moment du prélèvement
- Qualité
- Quantité

REACTIFS:
Adéquats, Stables, Efficaces, Qualité, Disponibles en permanence, Validés

CONTRÔLES APPROPRIÉS:
- Positifs et Négatifs
- Contrôle Qualité Interne

QUALITY

EQUIPMENTS:
Fiables, conformes aux besoins techniques, Compatible, Utilisation et maintenance facile, Validés

TESTS:
Répond au besoin et objectif, Validé, Spécificité, Sensibilité

EVALUATION:
Contrôle Qualité Externe
Audit , EILA

DOCUMENTATION:
Politique, plans, procédures, MO, rapport des tests, procédures de contrôle qualité, enregistrement de suivi et résultats, audits..

Fiabilité des procédures, utilisation de MO standardisés

Composantes de l'assurance qualité du test

1) Contrôle Qualité Interne 2) Evaluation Externe

ISO/IEC 17025:2005(E)

Saga Web pour ANSES le 4/12/2010 21:08 *NF EN ISO/CEI 17025:2005-09*

5.9 Assuring the quality of test and calibration results

5.9.1 The laboratory shall have quality control procedures for monitoring the validity of tests and calibrations undertaken. The resulting data shall be recorded in such a way that trends are detectable and, where practicable, statistical techniques shall be applied to the reviewing of the results. This monitoring shall be planned and reviewed and may include, but not be limited to, the following:

a) regular use of certified reference materials and/or internal quality control using secondary reference materials;

b) participation in interlaboratory comparison or proficiency-testing programmes;

c) replicate tests or calibrations using the same or different methods;

d) retesting or recalibration of retained items;

e) correlation of results for different characteristics of an item.

NOTE The selected methods should be appropriate for the type and volume of the work undertaken.

5.9.2 Quality control data shall be analysed and, where they are found to be outside pre-defined criteria, planned action shall be taken to correct the problem and to prevent incorrect results from being reported.

1) Controle Qualité Interne

= Echantillon(s) qui doit être inclu dans chaque essai

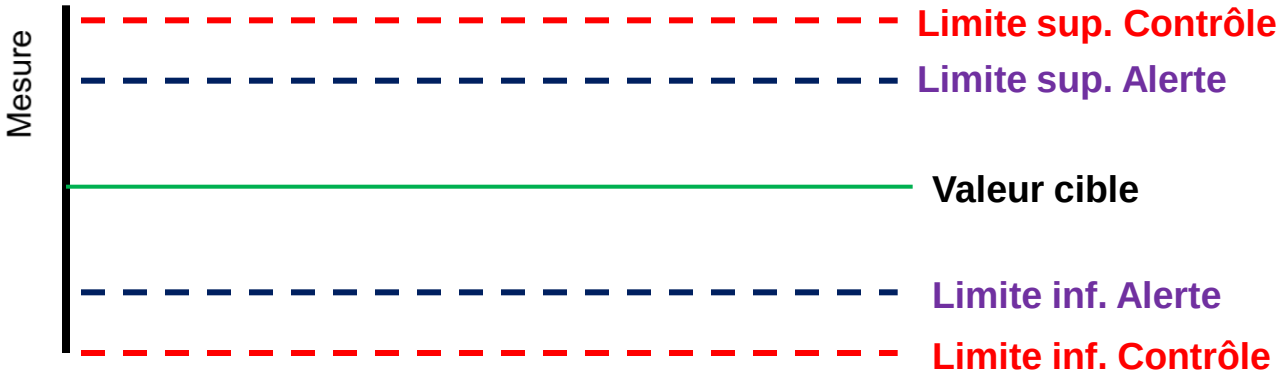
- **pour vérifier que le test est valide et les résultats sont correctes**

- **erreurs (éventuelles) sont quantifiées pour permettre de décider si elles sont acceptables ou non et celles inacceptables sont détectées afin que des actions correctives soient mises en place et que des résultats erronés ne soient pas communiqués.**

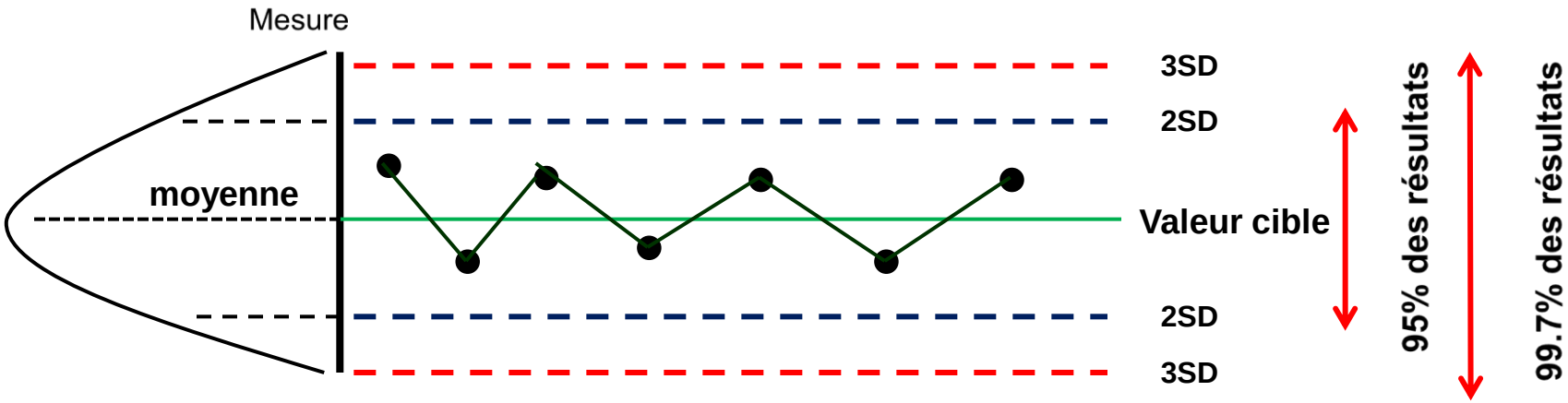
Outil pour analyse CQI

Carte de contrôle de Shewart

Walter Shewhart



Distribution des résultats du CQI



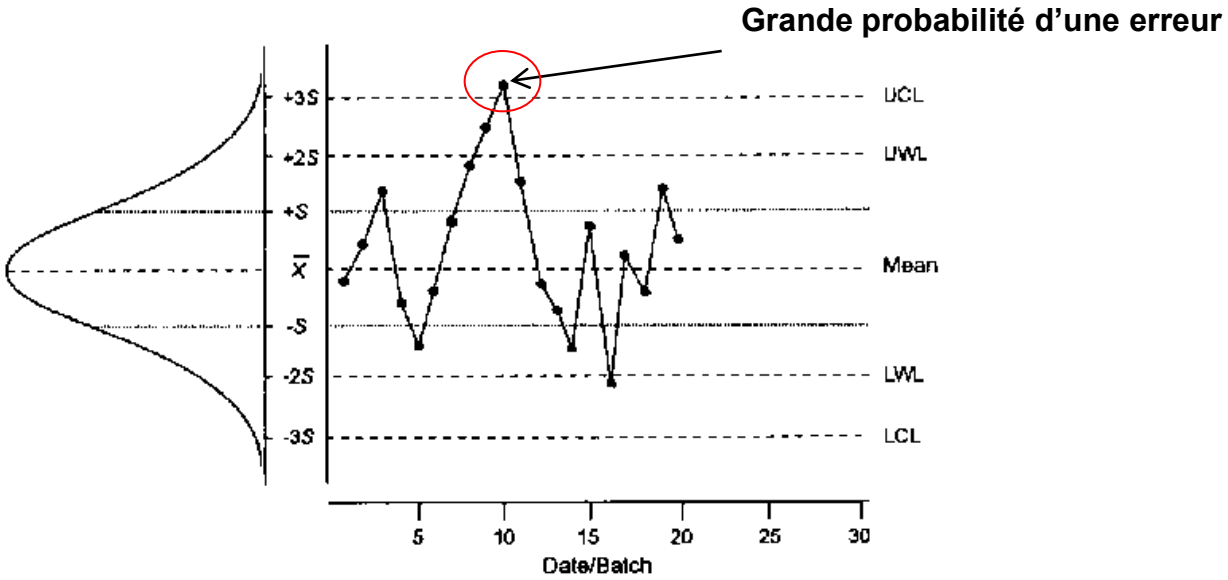
S'il n'y a pas d'erreurs, les valeurs suivent une distribution normale

Erreurs

Erreur = l'écart entre le résultat de la mesure et la vraie (ou acceptable) valeur

➢ **Erreur aléatoire**

- **Varie de façon imprévisible, en grandeur et en signe, quand un grand nombre de mesures de la même quantité sont réalisés dans des conditions identiques.**
- **Crée une propagation caractéristique des résultats et ne peut pas être corrigée en en appliquant des corrections.**

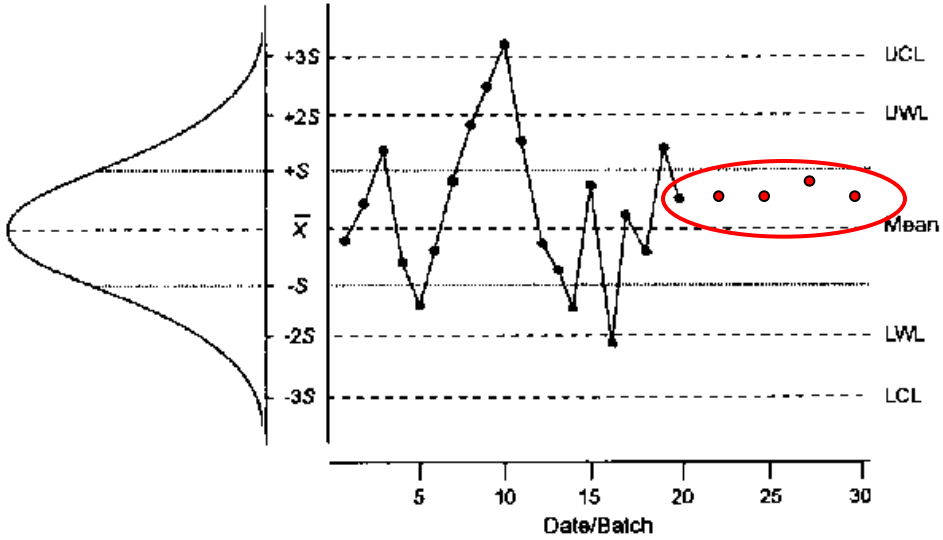


Exemple: erreur de pipetage, modification du temps d'incubation.

Erreurs

➢**Erreur Systematique**

- Une erreur qui reste constante lorsque des mesures sont réalisées dans les mêmes conditions, ou varie selon une loi définie lorsque les conditions changes.
- Créer un biais caractéristique dans les résultats des tests et peut être corrigée en appliquant une correction



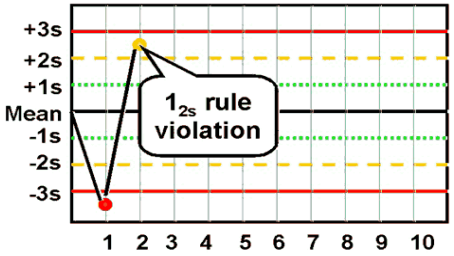
Peut être induite par exemple par: variation de température d'incubation, bouchage de laveur de plaque, changement de lot de réactif, changement de la méthode

Comment interpréter la carte du contrôle?

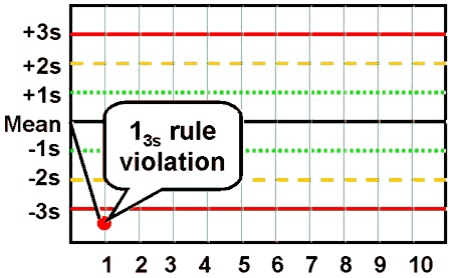
Règles de Westgard : basées sur des méthodes statistiques pour analyser les données de la carte de contrôle de Shewhart.

James WESTGARD

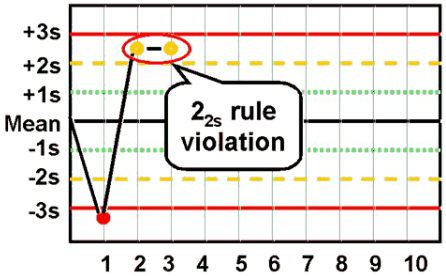
Alerte 1_{2SD}



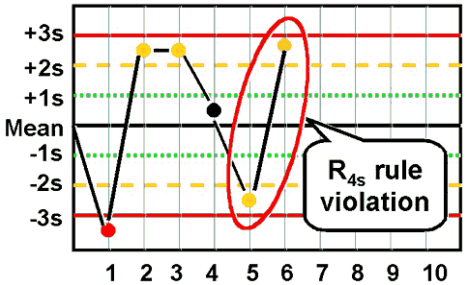
Contrôle 1_{3SD}



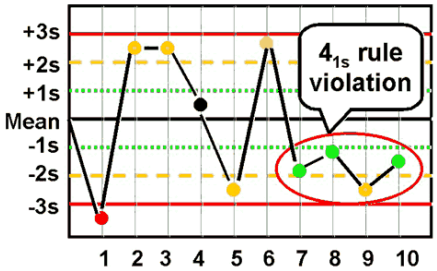
Alerte 2_{2SD}



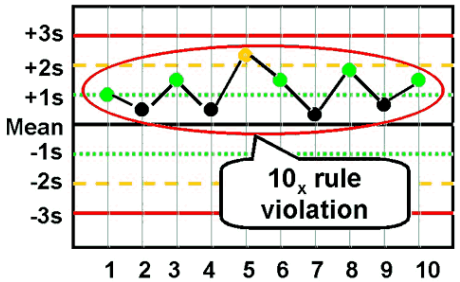
Contrôle R_{4SD}



Alerte 4_{1SD}



Contrôle 10x



2) Evaluation Externe

3 types :

- Contrôle Qualité Externe (CQE): EILA, organisateur indépendant fourni des échantillons identiques ou similaires à plusieurs laboratoires pour analyse (ISO/CEI 17043)
- Vérification: Laboratoire envoi des échantillons à un laboratoire de référence pour vérifier ses résultats
- Visite du laboratoire: Evaluation par des experts(Audit)

Contrôle Qualité Externe

1. Identifier les lacunes possibles dans la pratique de laboratoire, guider les participants dans toutes actions correctives qui doivent être mises en place pour l'amélioration;
2. Identifier les caractéristiques de fiabilité des méthodes particulières, matériels et équipements dans des conditions de routine et proposer des mesures correctives, le cas échéant;
3. Comparer la performance du laboratoire par rapport aux autres laboratoires;
4. Evaluer et suivre l'impacte des formations; aider dans la préparation de futures formations.

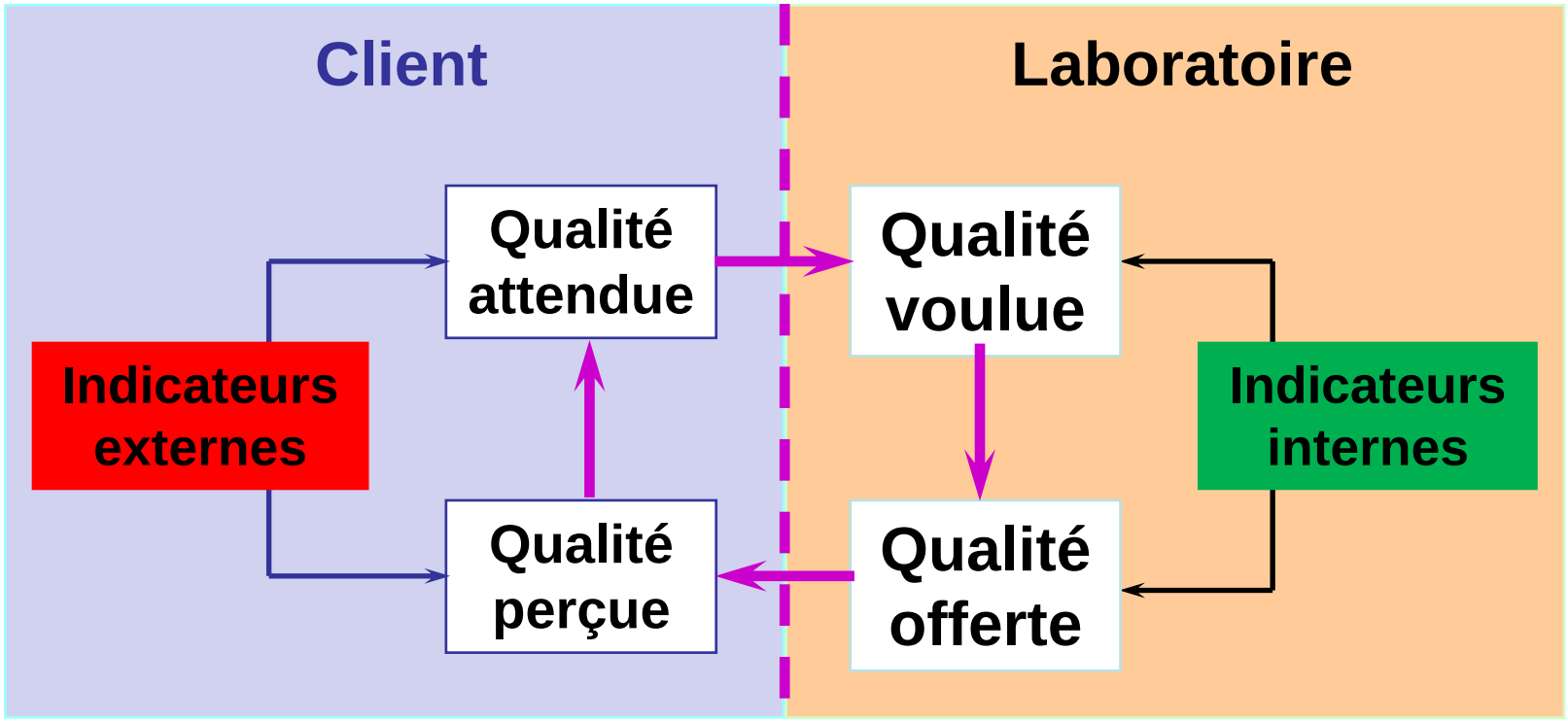
Vérification

1. Envoi régulier d’échantillons à un laboratoire de référence pour vérification des résultats obtenus;
2. Echantillons ciblés et/ou au hasard
3. De préférence en aveugle, un ou plusieurs

Visite du laboratoire

1. Pour évaluation du laboratoire (audit régulier)
2. Pour accréditation ISO17025
3. Après des problèmes répétés et non résolus
4. Après une session de formation (mise en pratique de la foramtion)

RESUME



projet-idea.u-strasbg.fr

Conclusion

ATTENTES
EXIGENCES
RÉGLEMENTATION
CONCURRENCE
IL NOUS RATTRAPE !
MAINTENANT, TU SAIS CE QUE « AMÉLIORATION CONTINUE » VEUT DIRE !
ISO 9000
ISO 14000
PK2002

anses
alimentation, environnement, travail

RECHERCHE DES ANTIGÈNES DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE PAR ELISA DE CAPTURE (SANDWICH) INDIRECT

ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE

21-25 mai 2012

Aurore ROMEY & Anthony RELMY
Laboratoire de Santé Animale

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort

Domaine d’application

- Ce test est utilisé en cas d’alerte de suspicion de Fièvre Aphteuse (FA). Cette maladie touche un large spectre d’espèces animales (Bovin, Ovin, Caprin, Porcin). Cette méthode d’analyse peut-être utilisée pour toutes ces espèces.

- On peut utilisé cette méthode soit sur du broyat d’aphte, culture cellulaire (suite à un isolement), ou encore sur du liquide vésiculaire (en grande quantité)

- Cette méthode a pour but de détecter l’antigène du virus de la Fièvre Aphteuse (FA), capturé par des anticorps spécifiques du virus. Ainsi d’effectuer un diagnostic différentiel entre la fièvre aphteuse et la maladie vésiculeuse du porc.

- Cette méthode permet aussi de pouvoir déterminer le sérotype du virus, à l’aide de couple d’anticorps (Anticorps de Lapin anti-FA, et Anticorps de Cobaye Anti-FA) spécifiques de 7 sérotypes :
O, A, C Noville, SAT1, SAT2, SAT3, Asia.

Principe de la méthode

- Les anticorps polyclonaux de Lapin anti-sérotype sont sensibilisés au fond de la plaque.

- Après un lavage, l'étape de capture s'effectue en ajoutant, soit les contrôles positifs, soit l'échantillon à tester.

- Après un second lavage, l'étape de sandwich est réalisée avec les anticorps polyclonaux de cobaye anti-sérotypes.

- Après un troisième lavage, on ajoute un conjugué anti-cobaye marqué à la péroxydase.

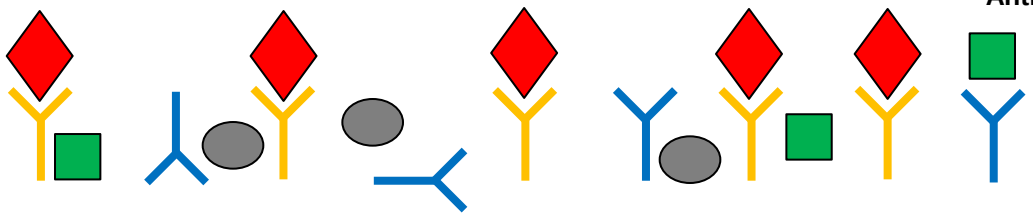
- Après un quatrième lavage, on révèle à l'aide de l'ODP (substrat) qui va permettre de faire une lecture colorimétrique.

Plan de plaque type

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Omanisa 1/5	Omanisa 1/25	Omanisa 1/125	PBS-Tween	Ech 1	Ech 1	Ech 1	PBS-Tween	Ech 2	Ech 2	Ech 2	PBS-Tween
B	A5/22/24 1/5	A5/22/24 1/25	A5/22/24 1/125	PBS-Tween	Ech 1	Ech 1	Ech 1	PBS-Tween	Ech 2	Ech 2	Ech 2	PBS-Tween
C	Cnoville 1/5	Cnoville 1/25	Cnoville 1/25	PBS-Tween	Ech 1	Ech 1	Ech 1	PBS-Tween	Ech 2	Ech 2	Ech 2	PBS-Tween
D	SAT1 1/5	SAT1 1/25	SAT1 1/125	PBS-Tween	Ech 1	Ech 1	Ech 1	PBS-Tween	Ech 2	Ech 2	Ech 2	PBS-Tween
E	SAT2 1/5	SAT2 1/25	SAT2 1/125	PBS-Tween	Ech 1	Ech 1	Ech 1	PBS-Tween	Ech 2	Ech 2	Ech 2	PBS-Tween
F	SAT3 1/5	SAT3 1/25	SAT3 1/125	PBS-Tween	Ech 1	Ech 1	Ech 1	PBS-Tween	Ech 2	Ech 2	Ech 2	PBS-Tween
G	ASIA 1/5	ASIA 1/25	ASIA 1/125	PBS-Tween	Ech 1	Ech 1	Ech 1	PBS-Tween	Ech 2	Ech 2	Ech 2	PBS-Tween
H	MVP 1/5	MVP 1/25	MVP 1/125	PBS-Tween	Ech 1	Ech 1	Ech 1	PBS-Tween	Ech 2	Ech 2	Ech 2	PBS-Tween

Schéma explicatif (1)

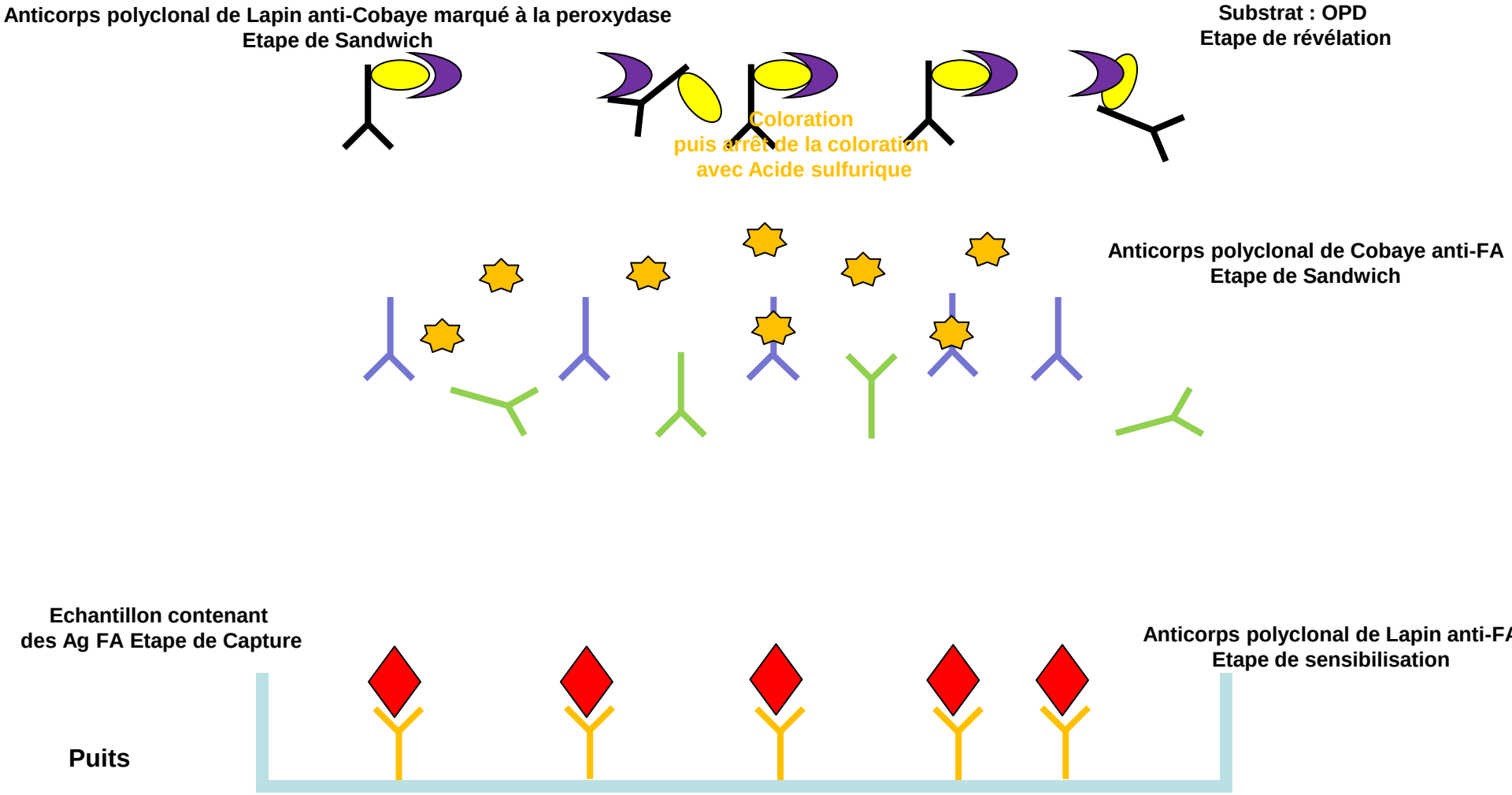
Echantillon contenant des Ag FA



Anticorps polyclonal de Lapin anti-FA
Etape de sensibilisation

Puits

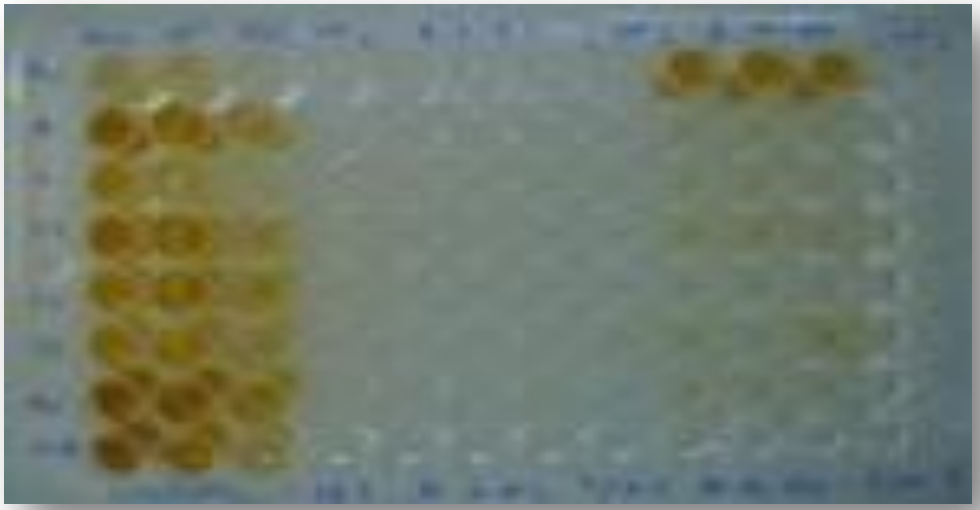
Schéma explicatif (2)



Interprétation des résultats

- **Les contrôles sont des Antigènes inactivés et doivent sortir positifs. Ils doivent avoir une DO supérieure à 0,1. Ces contrôles sont calibrés pour que la dilution au 1/5ème soit proche de 2,000.**

- **Un échantillon est positif lorsqu'il est supérieur à 0,1 en enlevant la DO du bruit de fond des témoin blanc (PBS-Tween).**



Exemple de résultats obtenus au laboratoire ANSES 2011

RECHERCHE DES ANTIGÈNES DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

PAR ELISA DE CAPTURE (KIT ITALIEN)

Principe de la méthode

- Les plaques sont pré-sensibilisées avec des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre les antigènes de chaque sérotype, selon le kit. Ici, avec SAT1, SAT2.

- L’échantillon est mis dans ces puits pré-sensibilisés : étape de capture.

- L’étape de sandwich est effectuée avec des anticorps monoclonaux spécifiques pan Sérotype, marqués à la péroxydase.

- La révélation s’effectue avec le TMB (substrat) pour effectuer une analyse colorimétrique.

Plan de plaque type

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Type O		Type A				Pan O, A, Asia		SAT1		SAT2	
A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A	Ech A
B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B	Ech B
C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C	Ech C
D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D	Ech D
E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E	Ech E
F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F	Ech F
G	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+
H	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-

Interprétation des résultats

- Les contrôles positifs doivent avoir une DO supérieure à 1,000. Les contrôles négatifs doivent avoir une DO inférieure à 0,1.

- Un échantillon est positif lorsque sa DO est supérieure à 0,1 en enlevant la DO du bruit de fond des témoins négatifs.

RECHERCHE DES ANTICORPS SPECIFIQUES DES PROTEINES NON STRUCTURALES DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

PAR ELISA PRIOCHECK FMDV-NSP

Domaine d’application

- Ce test est utilisé en première intention lors d’un suivi sérologique dans un cheptel suite à un cas de suspicion ayant entrainé une vaccination d’urgence.

- Ce test permet de détecter la présence d’anticorps dirigés contre les protéines non structurales, qui sont présentes lorsque qu’il y a une infection virale. Les animaux vaccinés ne présentent pas de protéines non structurales, les anticorps reconnaissent les protéines structurales.

- Ce test permet de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés , notamment en utilisant la protéine non structurale, 3ABC, présente lors d’une infection par le virus.

- Ce test a un large spectre, c’est-à-dire qu’il peut être utilisé chez les bovins, ovins, caprins et porcins.

- Cette méthode permet de statuer sur la présence des anticorps dirigés contre le virus, tout sérotype confondu.

Principe de la méthode

- Ce test est un ELISA de type bloquant en phase solide.

- Les plaques sont pré-sensibilisées avec un anticorps monoclonal spécifique la protéine 3ABC, puis de la protéine recombinante 3ABC.

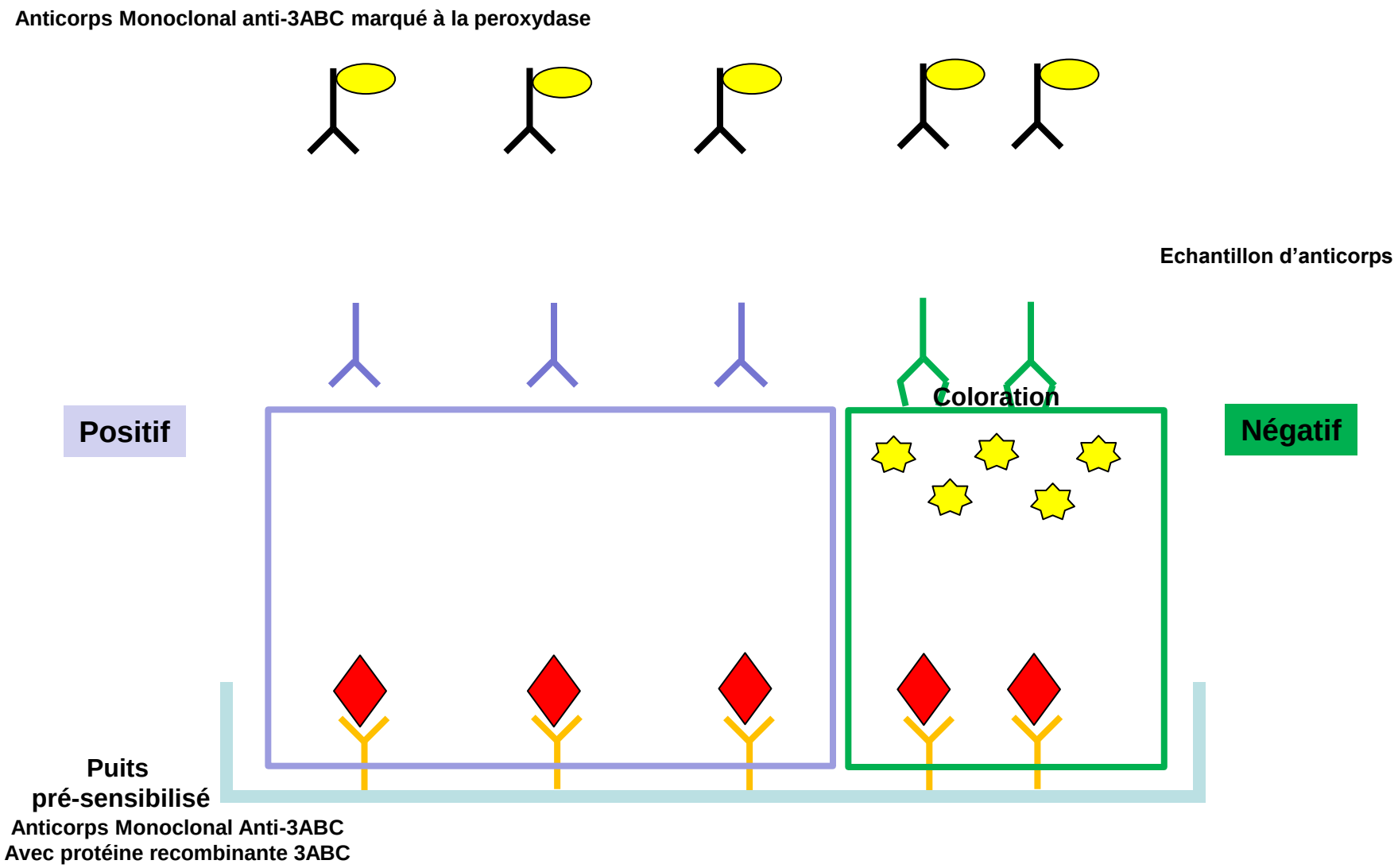
- On ajoute l'échantillon a testé sur les puits pré-sensibilisés, puis on lave.

- On ajoute le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique Anti-3ABC marqué à la péroxydase. En présence d'anticorps non structural dans l'échantillon, ce conjugué ne peut pas se fixer sur la 3ABC.

- Après lavage, on révèle avec un substrat, la présence d'anticorps dirigés contre la protéine non structurale dans l'échantillon se traduit par une absence de coloration.

A l'inverse une absence d'anticorps dirigés contre la protéine non structurale se traduit par une présence de coloration.

Schéma explicatif



Interprétation des résultats

- Le test est valide si les différents contrôles du kit sont valides :
  - DO max > 1,000
  - % inh du contrôle positif faible > 50%
  - % inh du contrôle positif fort > 70%

- Formule de calcul du pourcentage d'inhibition :
  - **$\% \text{ inh} = 100 - (DO_{\text{contrôles ou échantillon}} / DO_{\text{max}}) \times 100$**

- L'échantillon est positif si le % inh est ≥ 50%

- L'échantillon est négatif si le % inh est < 50%

eufmd

european commission for the control of foot-and-mouth disease

ATELIER DE FORMATION
LE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE

Laboratoire de Santé Animale
Maisons-Alfort

21-25 mai 2012

anses
alimentation, environnement, travail

Agenda

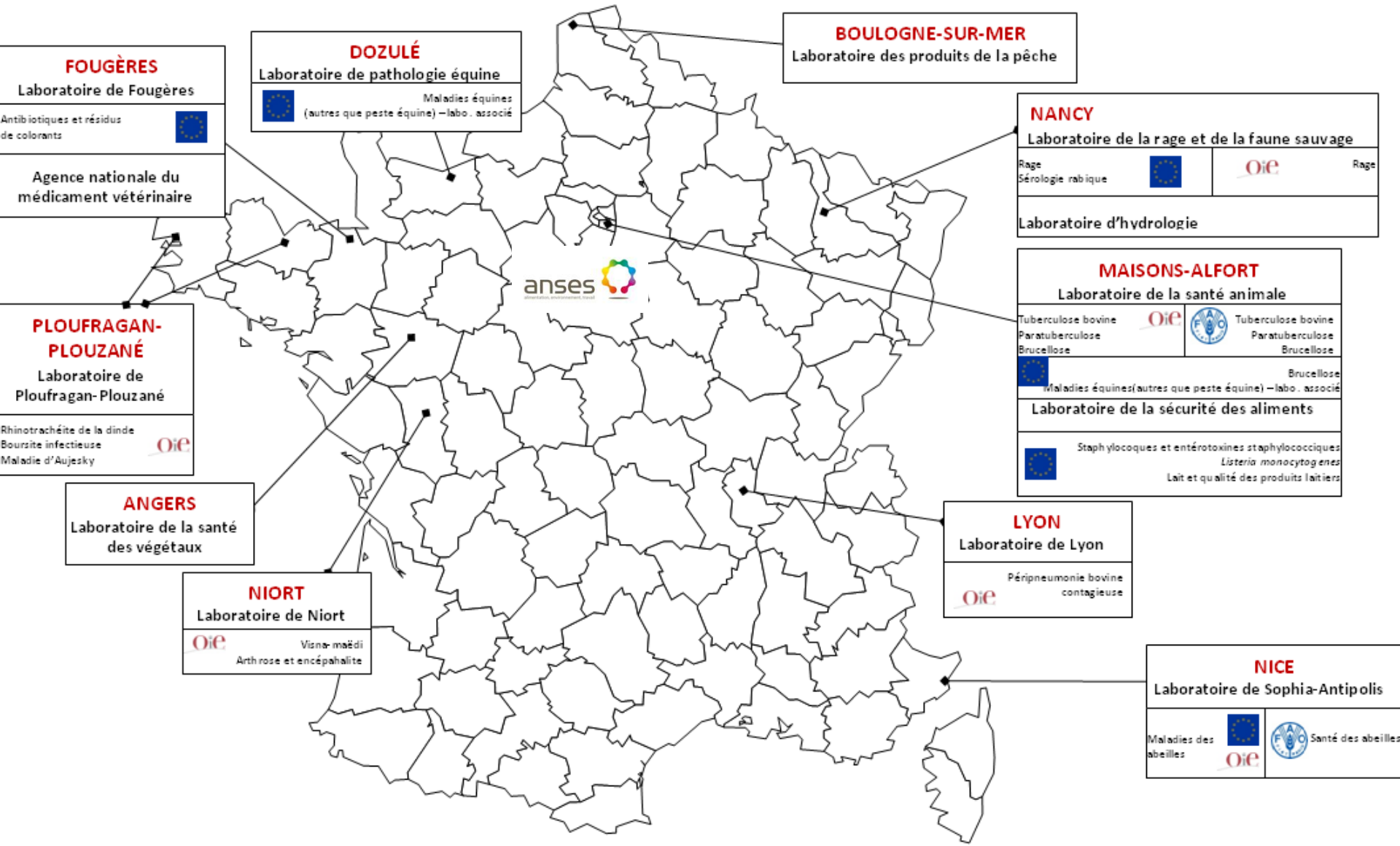
Lundi 21	
9h-9h30	Accueil des participants
9h30 -10	Réunion d'ouverture
10h -12	Présentation : Lutte contre la fièvre aphteuse
12h -14h	Déjeuner
14h -15	Présentation : PCR en temps réel
15h -16	Présentation : Biosécurité dans le laboratoire
16h -17h	Présentation : Assurance qualité en diagnostic
Mardi 22	
8h-12	Partie pratique :Préparation des échantillons; test Svanodip; Isolement viral sur cellule
12h -14h	Déjeuner
14h -17	Partie pratique :Extraction d'ARN ; RT-PCR classique
Mercredi 23	
8h-12	Partie pratique :RT-PCR en temps réel ; Isolement viral (suite) ; RT-PCR classique (électrophorèse)
12h -14h	Déjeuner
14h -17	- Analyse et interprétation des résultats de RT-PCR - Présentation : Typage du FMDV par Ag-ELISA
Jeudi 24	
8h-12	Partie pratique : Ag – ELISA (IAH) ; Isolement viral (suite)
12h-14	Déjeuner
14h-17	Partie pratique :Ag – ELISA (IZSLER) ; ELISA NSP
Vendredi 25	
8h-12	Partie pratique :ELISA NSP
12h-14	Déjeuner
14h-16	- Réunion de clôture

anses

ANSES

www.anses.fr

Laboratoires de l'ANSES



Unité mixte de recherche virologie 1161 - UMR VIRO

VIRO
UMR 1161
INRA - ANSES - ENVA

le 7 mars 2011

Pascal BOIREAU

Directeur du Laboratoire de santé animale

PTR
Institut Pasteur
ELOIT Marc

ZIENTARA Stephan (ANSES)
Directeur

RICHARDSON Jennifer (INRA)
Directrice Adjointe

BAKKALI - KASSIMI Labib (ANSES)
Adjoint au Directeur

Secrétariat
Pascale Rivier (ANSES) (CDI)

Services communs
ALLAL Aurélia (ANSES) (CDI)
BEBE-LONGANGE Olivier (ANSES) (CDDI)
JEAN-MORENS Andrée-Rose (INRA)

Equipe Vaccins Adénoviraux

KLONJKOWSKI Bernard (DGER)
Responsable
RICHARDSON Jennifer (INRA)
Responsable

Chercheurs et enseignants chercheurs
CORDONNIER Nathalie (DGER)
KLONJKOWSKI Bernard (DGER)
RICHARDSON Jennifer (INRA)

ITA
GALEA Sandra (DGER)
GAVARD Françoise (INRA)

Thèse d'université
SULEMAN Muhammad (Paris VII)
ZHOU Xiaocui (Paris EST)
CAROZZO Marlène (Anses-Cirad)

Master 2

Equipe Virus entériques et Barrière d'Espèces

LE PODER Sophie (DGER)
Responsable
PAVIO Nicole (ANSES)
Responsable

Chercheurs et enseignants chercheurs
LE PODER Sophie (DGER)
PAVIO Nicole (ANSES)

ITA
BARNAUD Elodie (ANSES) (CDI)
DUARTE Lidia (INRA)

Post-Doctorant
ROGEE Sophie

Thèse d'université
BOUQUET Jérôme

Master 2
AHODANTIN James

Equipe Physiopathologie des Orbivirus

ZIENTARA Stéphan (ANSES)
Responsable
BREARD Emmanuel (ANSES)
Responsable

Chercheurs et enseignants chercheurs
BREARD Emmanuel (ANSES)
VITOUR Damien (ANSES) (CDI)
ZIENTARA Stephan (ANSES)

HANS Aymeric* (ANSES)

ITA
ADAM Micheline (INRA)
DESPRAT Alexandra (ANSES) (CDD)
SAILLEAU Corinne (ANSES)
VIAROUGE Cyril (ANSES) (CDI)

Post-Doctorant
BERGERON Corinne

Thèse d'université
CHAUVEAU Emilie

Equipe Biologie des Picornavirus

BAKKALI-KASSIMI Labib (ANSES)
Responsable

Chercheurs et enseignants chercheurs
BAKKALI KASSIMI Labib (ANSES)
BLAISE-BOISSEAU Sandra (ANSES)

ITA
GORNA Kamila (ANSES) (CDI)
RELMY Anthony (ANSES) (CDI)
ROMEY Aurore (ANSES)

Thèse d'Université
CAROCCI Margot (Paris VII)

Master 2
LEBOUCHER Emilye

Equipe Neurovirologie de zoonoses

COULPIER Muriel (INRA)
Responsable
LECOLLINET Sylvie (ANSES)
Responsable

Chercheurs et enseignants chercheurs
BECK Cécile (ANSES))
COULPIER Muriel (INRA)
LECOLLINET Sylvie (ANSES) (CDI)

ITA
BAHUON Céline (ANSES)
LOWENSKI Steeve (ANSES) (CDD)
MAINGAULT Joslane (ANSES)

Post-Doctorant
DONADIEU Emilie

Animateur QUALITE INRA : GAVARD Françoise
Expérimentation animale ENVA:LEPODER Sophie
Correspondant QUALITE ANSES : BAKKALI-KASSIMI Labib
Correspondant H. & S. ENVA : ADAM Micheline
Réunions scientifiques :LEPODER Sophie
Correspondant FORMATION : RIVIER Pascale
Correspondant H. & S. ANSES : SAILLEAU Corinne, RELMY Anthony (titulaires), DESPRAT Alexandra, LOWENSKI Steeve (suppléants)
Biosécurité ENVA : KLONJKOWSKI Bernard
Equipements : BAKKALI KASSIMI Labib

*Site Dozulé

anses
alimentation, environnement, travail

LA FIEVRE APHTEUSE

ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE

21 mai 2012

Labib BAKKALI KASSIMI
Labib.bakkali-kassimi@anses.fr
Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort

anses

1916 USDA

Fièvre Aphteuse (FA)

Maladie ancienne mais reste une menace…

1514 Italie — — —

HISTORIQUE

- Longtemps confondue avec d'autres infections telle que la peste bovine.
- 1ère épizootie décrite en 1514 par Girolamo en Italie
- En France 1ère description 1662
- 1764 (Michel Sagar, Moravie), individualisation clinique
- 1808 l'italien Toggia la nome « fièvre aphteuse »
- 1860 prise de conscience de l'importance de la maladie par les pouvoirs publics (Allemagne réservoir en européen à cette époque)
- 1897 (Loeffler et Frosch) mise en évidence du virus (Premier virus isolé dans l'histoire de la virologie)
- 1922 (Vallée et Carré) identification des sérotypes O (Oise) et A (Ardennes)
- 1926 (Waldmann et Trautwein) identification du sérotype C (Allemagne)
- 1936 (Lawrence) identification des sérotypes SAT1 (South African Territories), SAT2, SAT3 et Asia 1 (Asiatique)
- 1926 (Vallée, Carré et Rinjard) préparation vaccin formolé à partir d'épithélium lingual
- 1938 (Waldmann et Köbe) vaccin FA formolé adsorbé sur hydroxyde d'aluminium, chauffé et normalisé

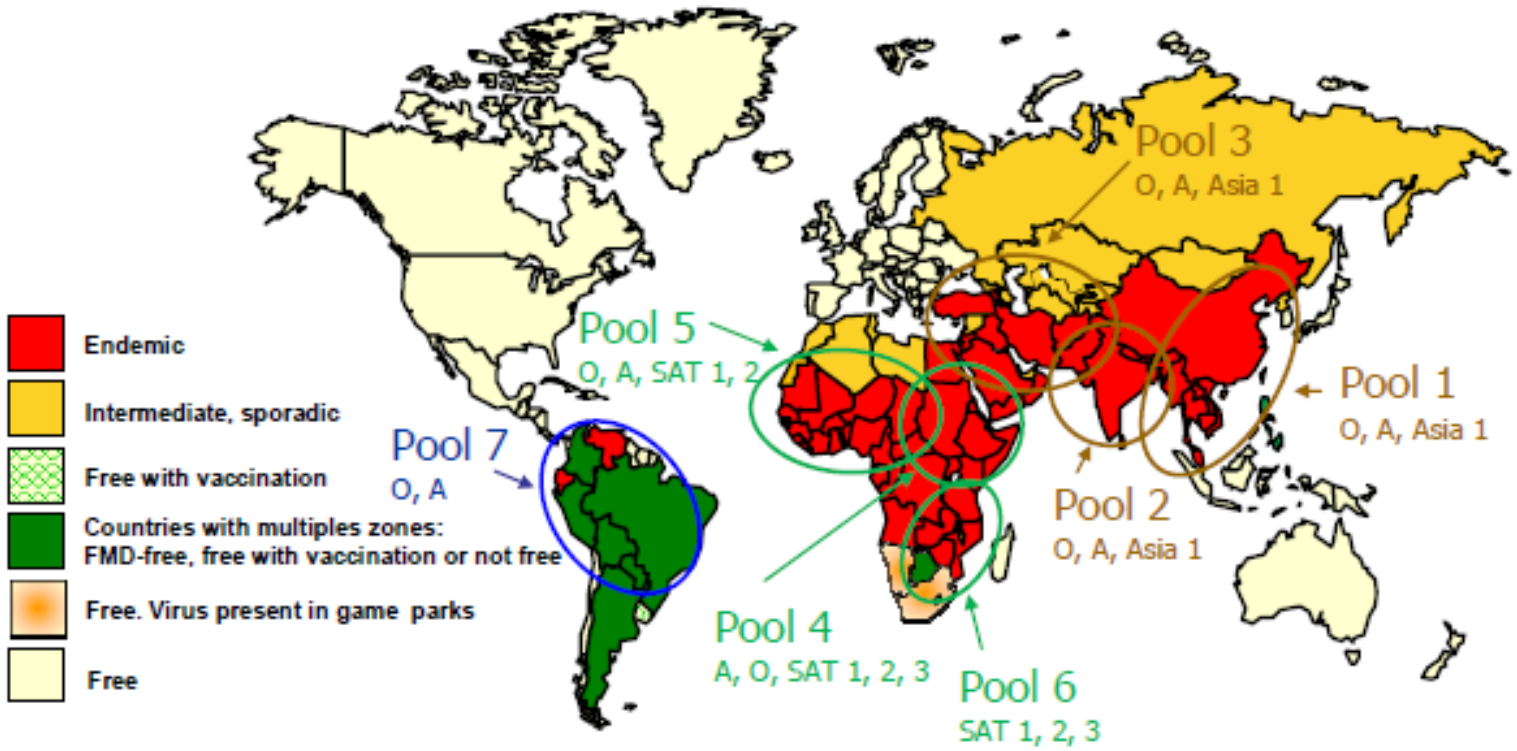
- 1901 Inauguration du Centre National de Recherche d'Alfort
- 1909 Institut de l'Ile de Riems (Allemagne)
- 1924 Weybridge et Pirbright (Angleterre)

LA MALADIE

- Extrêmement contagieuse
- Conséquences économiques dramatiques
- Très forte morbidité, faible mortalité
- Historiquement, l’un des virus les plus étudiés
- Répartition mondiale
- Sept sérotypes (O, A, C, Asia I, SAT1-3), absence d’immunité croisée.

LA MALADIE

Carte de distribution de la FA

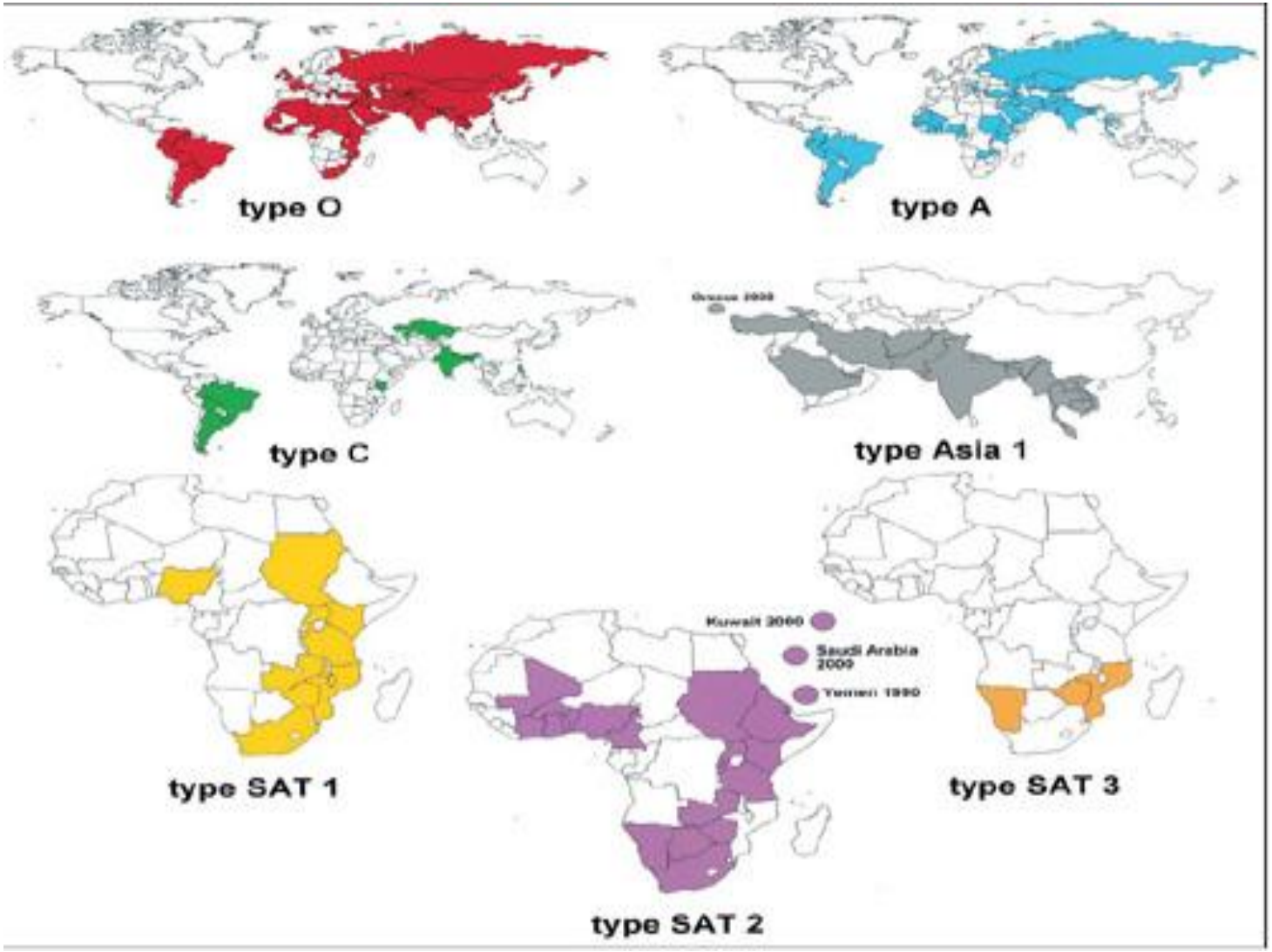


Pool positions are approximate and colours indicate that there are three principal pools, two of which can be subdivided into overlapping areas

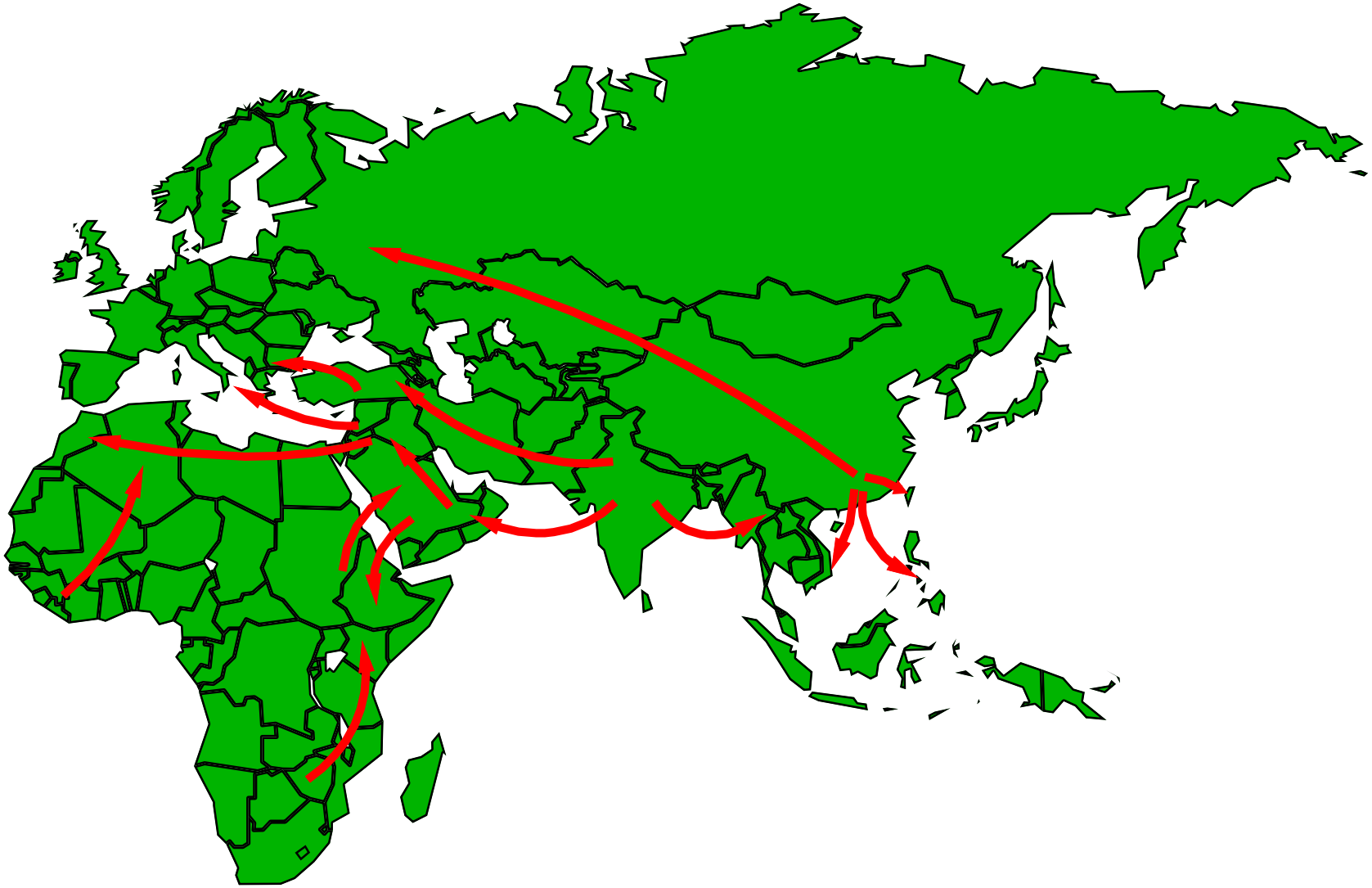
Paton D J et al. Phil. Trans. R. Soc. B 2009

LA MALADIE

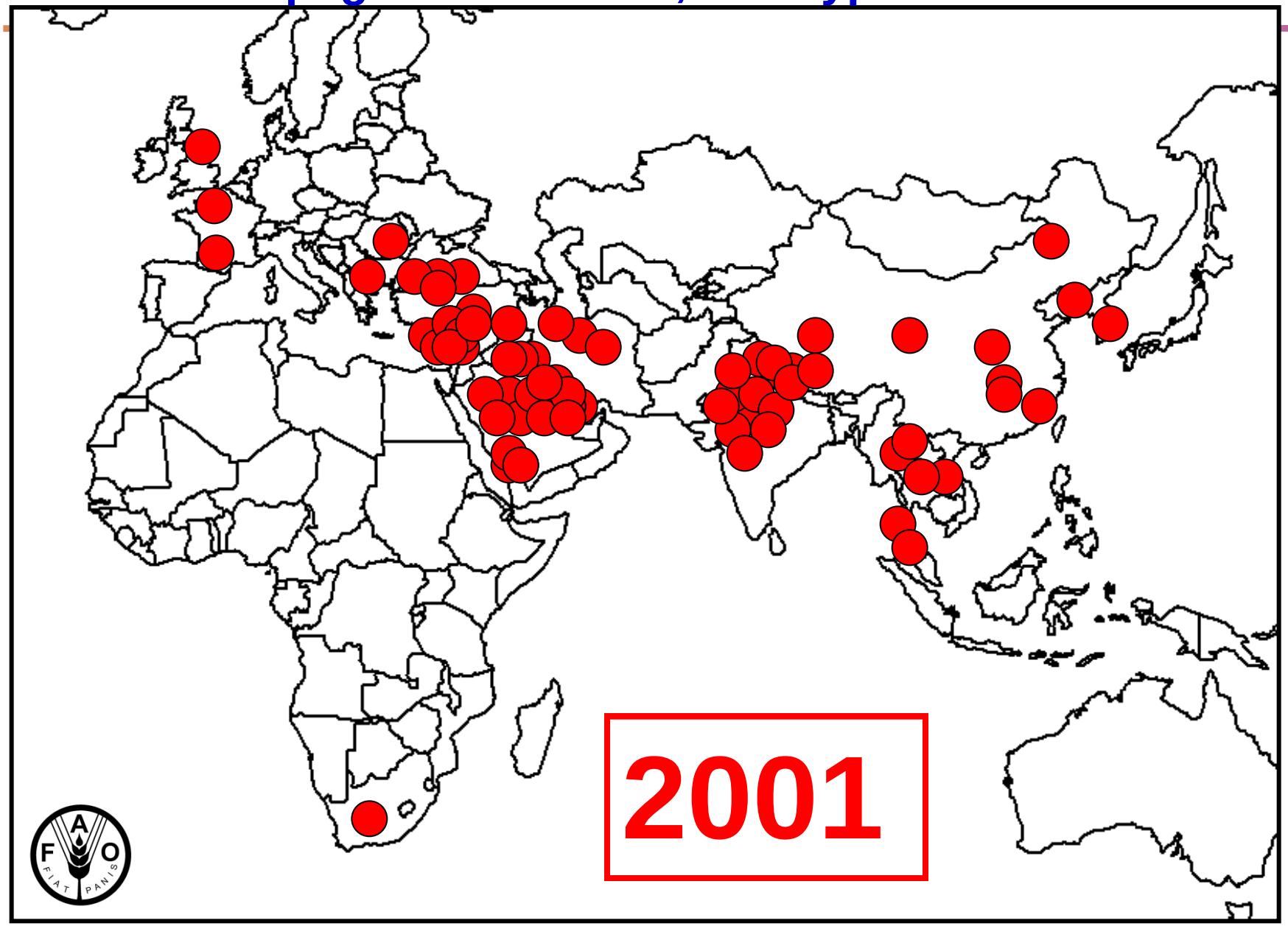
Carte de distribution de la FA 2000-2008



Propagation de FMDV



Propagation de la FA, Serotype O S-Asia



ESPÈCES AFFECTÉES

- Tous les artiodactyles:

  Bovidae

  Suidae

  Ovidae, Capridae

  Cervidae, Camelidae

  mais aussi éléphant, girafe, ours, ….
- Transmission à l’espèce humaine anecdotique

SIGNES CLINIQUES

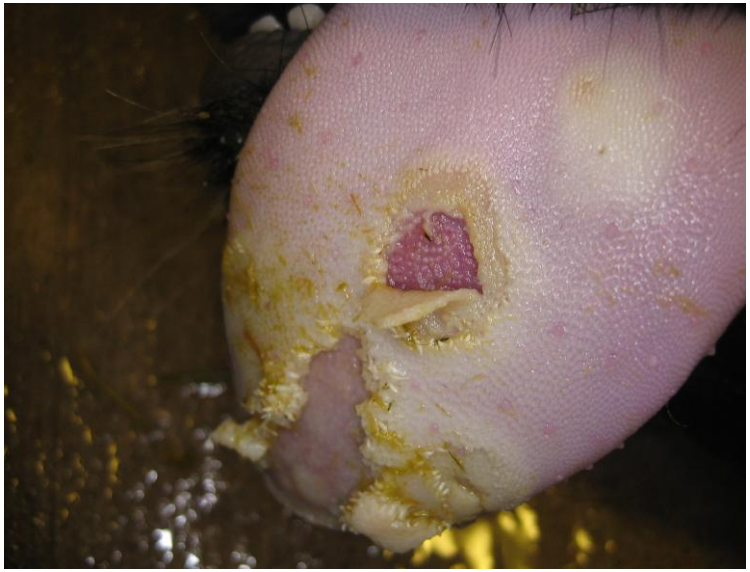
- Incubation: fièvre, anorexie → 2-8 j
- Formation des vésicules: naseaux, mufle, langue, gencives, bourrelet coronaire, fente interdigitée, talons, mamelle, rumen → 2 j
- Rupture des vésicules, ulcérations, infections → 2-3 j
- Nécroses → 4-5 j
- Avortement et mortalité chez les jeunes sans signes cliniques
- Cicatrisation → 2-8 j

(boiterie, hypersalivation, chute de la production lactée)

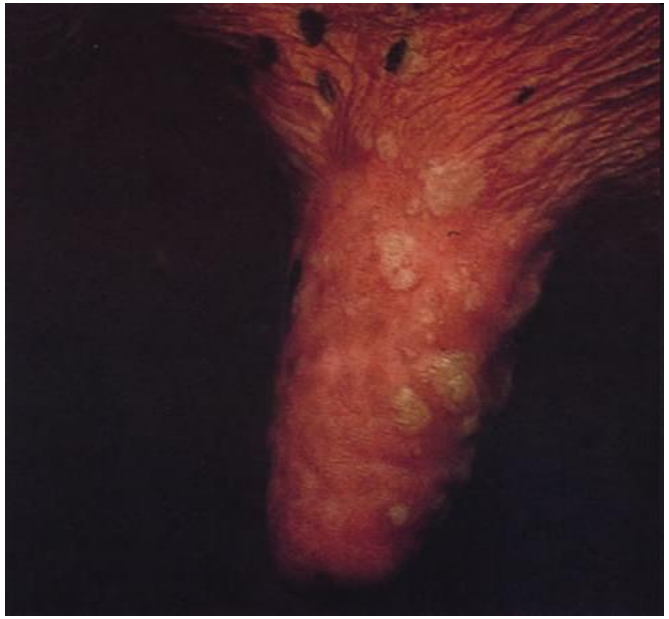
BOVINS

salivation excessive, bave, jetage nasal séreux

BOVINS

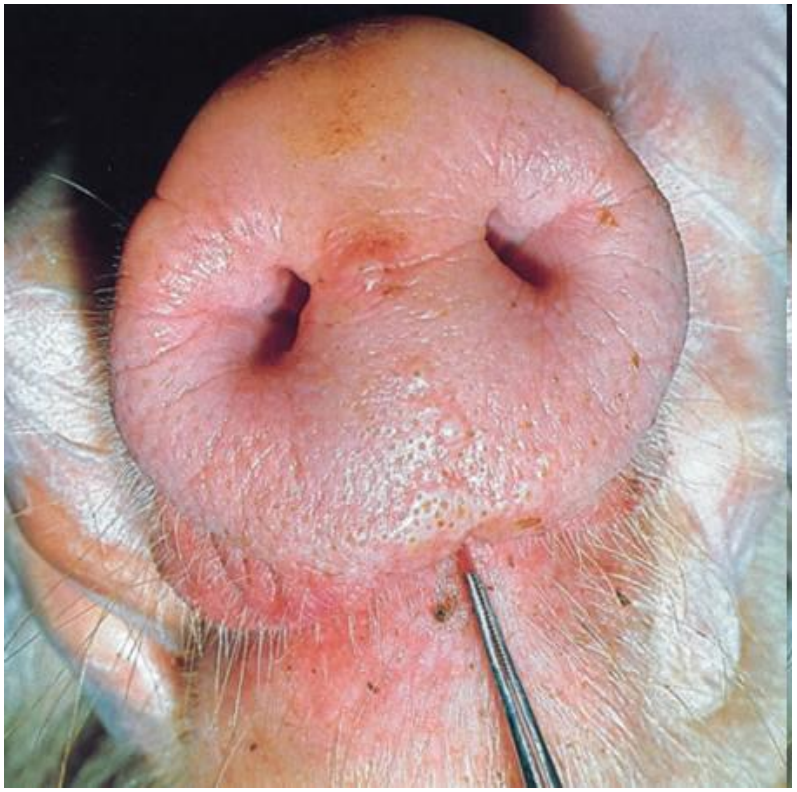


BOVINS



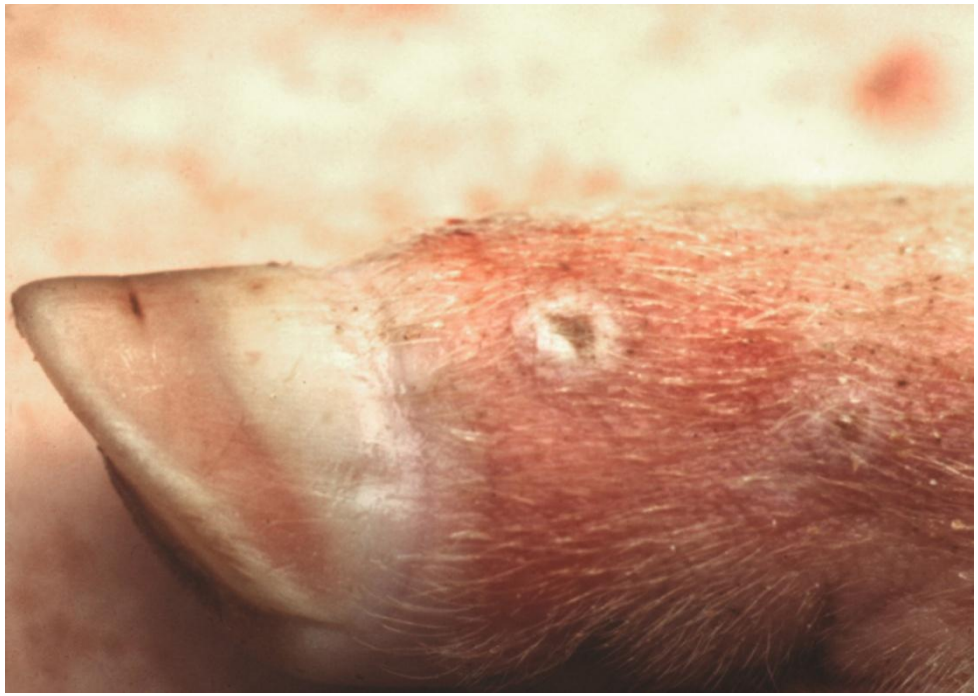
BOVINS

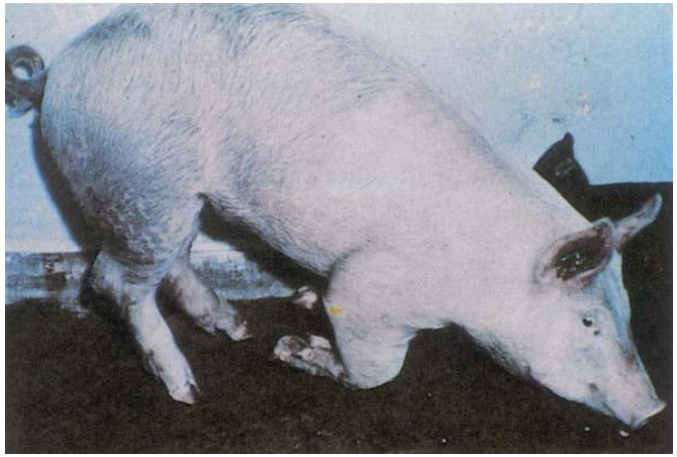
PORCINS



PORCINS

PORCINS





PETITS RUMINANTS

Ulcérations sur la gencive d'une chèvre
(photo J-M Gourreau, AFSSA)

Aphtes non rupturées sur la langue d'un mouton (photo J-M Gourreau, AFSSA)

PETITS RUMINANTS

Dr Barani, Iran

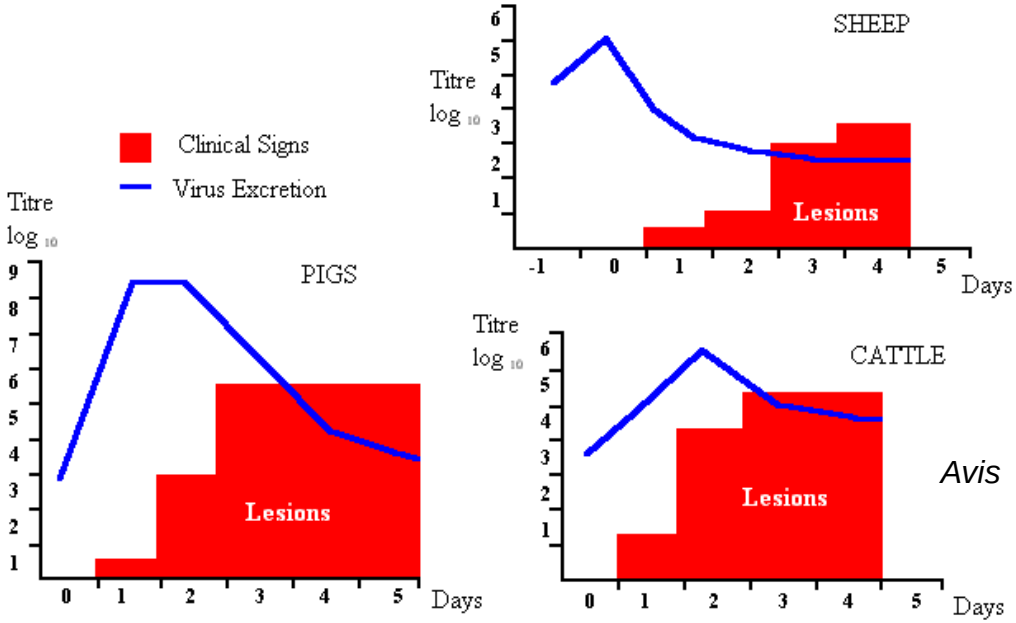
EXPRESSION CLINIQUE

- Bovin +++ animal révélateur
- Porc ++ amplificateur
- Mouton, chèvre + disséminateurs

PATHOGÉNÈSE

Source du virus:

- contact direct ou indirect avec des animaux infectés ou un environnement contaminé
- transfert aérienne de gouttelettes est probablement le mode le plus commun de transmission



Avis

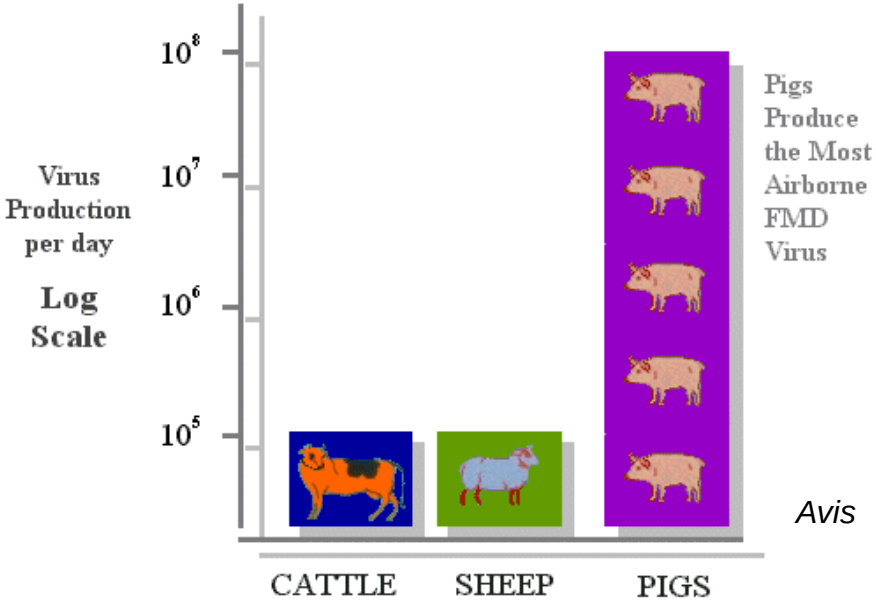
PATHOGÉNÈSE

Source du virus:

Porcs libèrent de grandes quantités de virus en suspension dans leur souffle expiré

- Porcs infectés: jusqu'à 400 millions $TCID_{50}$/jour

- Ruminants excrètent un maximum de seulement $1.2x10^5 TCID_{50}$/jour



Avis

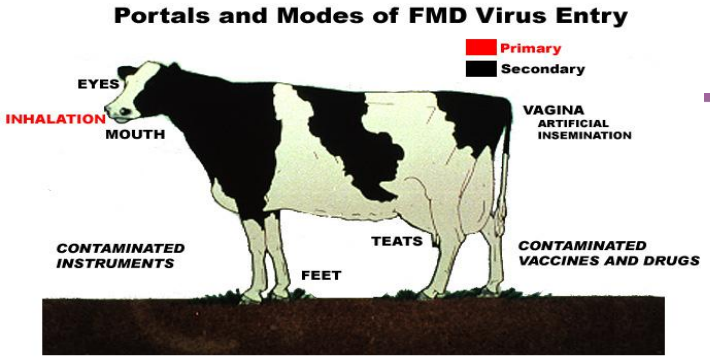
PATHOGÉNÈSE

Source du virus:

Virus présent dans toutes les sécrétions et excrétions

- Rupture des vésicules. (> 10^9 DI_{50}/ ml)
- Sécrétions lacrymales (bovins: $10^{6.1}$ à $10^{7.0}$$DI_{50}$/éch.)
- La salive (bovins: 10^6 à $10^{8.8}$ DI_{50}/ml)
- Urine (bovins: $10^{2,5}$ à $10^{5.5}$ DI_{50}/ml)
- Les matières fécales (bovins: de 10^2 à $10^{3,3}$ DI_{50}/g)
- Lait (bovins: 10^3 à $10^{4.5}$ DI_{50}/ml)
- Sperme: variable en quantité et en durée

PATHOGÉNÈSE



Voies d'entrée:

• voie respiratoire:

Voie majeure d'infection chez les ruminants

- Bovins et ovins: de très petites doses de virus peut déclencher l'infection (10-25 $TCID_{50}$)
- Porcs: faut100 fois plus de virus, mais plus grands générateurs d'aérosols infectés

• voie orale:

Des doses de virus beaucoup plus élevés sont nécessaires pour infecter des animaux par voie orale.

- Les ruminants sont rarement infectés naturellement par cette voie (10^5 $TCID_{50}$ pour les bovins).
- Porcs: voie fréquente

• voie cutanée:

A travers des blessures dans la peau ou des muqueuses

La réponse en anticorps contre la fièvre aphteuse

- les anticorps circulants sont détectés par ELISA 3 à 5 jours à compter de la première apparition de signes cliniques,
- Des niveaux élevés d'anticorps sont atteintes 2 à 4 jours plus tard
- Anticorps sont détectés habituellement par SN 1 à 2 jours plus tard que ELISA
- Le titre d'anticorps reste habituellement à un niveau relativement élevé pendant plusieurs mois après l'infection et les anticorps peuvent encore être détectés pendant plusieurs années chez les ruminants
- Chez les porcs, en particulier chez les jeunes en croissance rapide, les anticorps peuvent ne pas être détectables après quelques mois

Infection persistante et portage asymptomatique

(“carriers animals”)

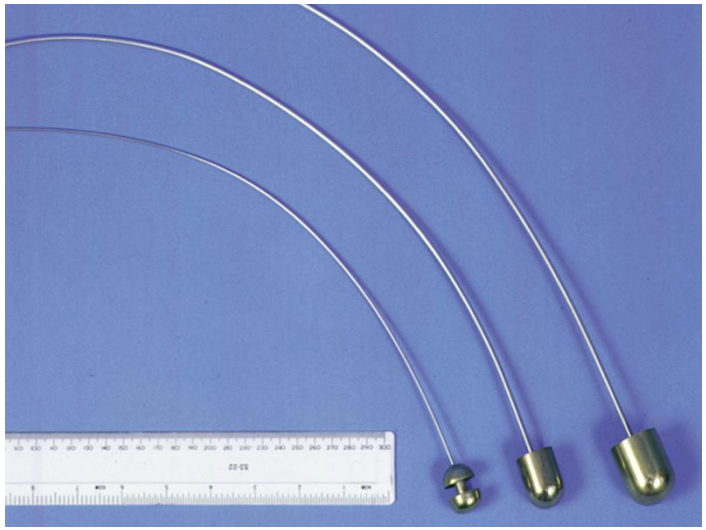
- Animal chez qui le virus peut être isolé à partir d'un prélèvement du pharynx plus de 28 jours post infection.
- Les porcs ne deviennent pas infectés de façon persistante.
- Jusqu'à 50% des ruminants deviennent infectés de façon persistante après la guérison clinique.
- Cette persistance de l'infection, ou l'état de porteur, se produit indépendamment du statut immunitaire de l'animal
- Les bovins vaccinés peuvent devenir porteurs après une exposition à l'infection

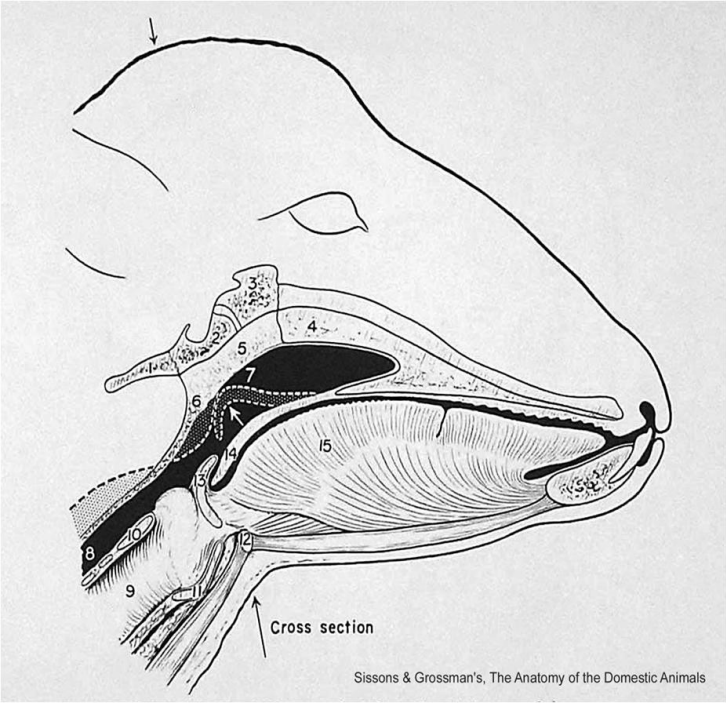
Infection persistante et portage asymptomatique

(“carriers animals”)

Durée maximale de l’état de portage enregistrée :

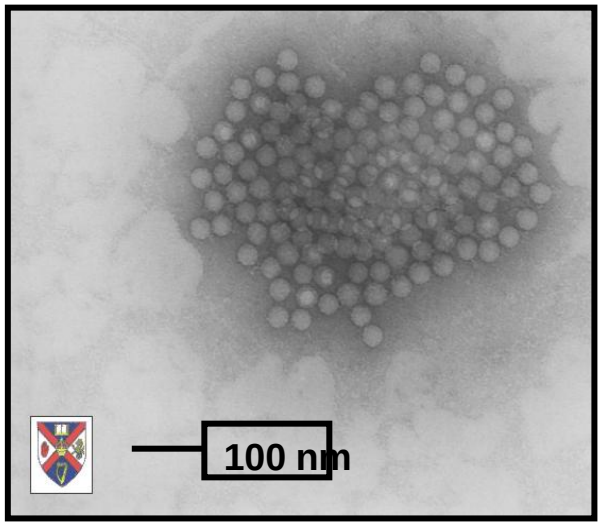
- Bovins	3,5 ans (généralement environ 1 an)
- Ovins	9 mois (généralement entre 1 et 5 mois)
- Caprins	4 mois
- Buffle africain	5 ans





Virus de la Fièvre Aphteuse (FMDV)

En 1897, Loeffler et Frösch élucidèrent la <u>nature transmissible de la fièvre aphteuse</u> et démontrèrent, <u>pour la première fois</u>, qu'une maladie animale pouvait être causée par un virus…



CLASSIFICATION

Famille des Picornaviridæ

12 genres dont 5 présents chez <u>l'homme:</u> (ICTV 2009)

•***<u>Les entérovirus</u>*** : les poliovirus, les virus coxsackie et les entérovirus

les rhinovirus humains de type A et B

•***Les aphtovirus*** **: les virus de la FA (7 sérotypes : O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3),** le virus de la rhinite équine de type A et le virus de la rhinite bovine B

•***<u>Les cardiovirus</u>*** : le virus de l'encéphalomyocardite et le virus de Theiler

•***<u>Les hépatovirus</u>*** : le virus de l'hépatite **A**

•***<u>Les paréchovirus</u>*** : les paréchovirus humains

•***<u>Les erbovirus</u>*** : le virus de la rhinite équine de type B

•***<u>Les kobuvirus</u>*** : le virus Aïchi

•***<u>Les teschovirus</u>*** : le virus de la maladie de Teschen chez le porc (entéro virus porcins 1-7)

•***Les sapelovirus :*** le Porcine sapelovirus

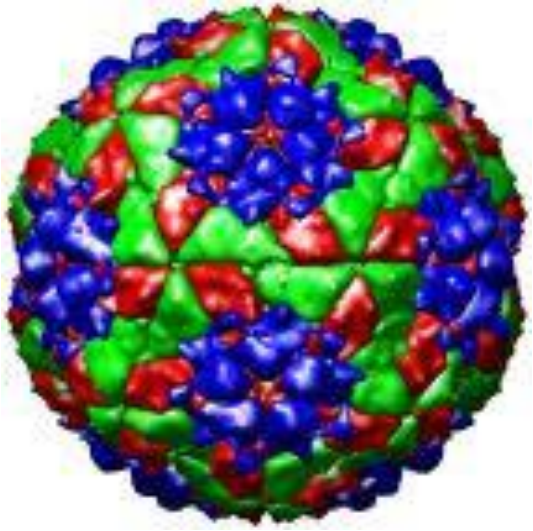
•***Les senecavirus :*** le Seneca Valley virus

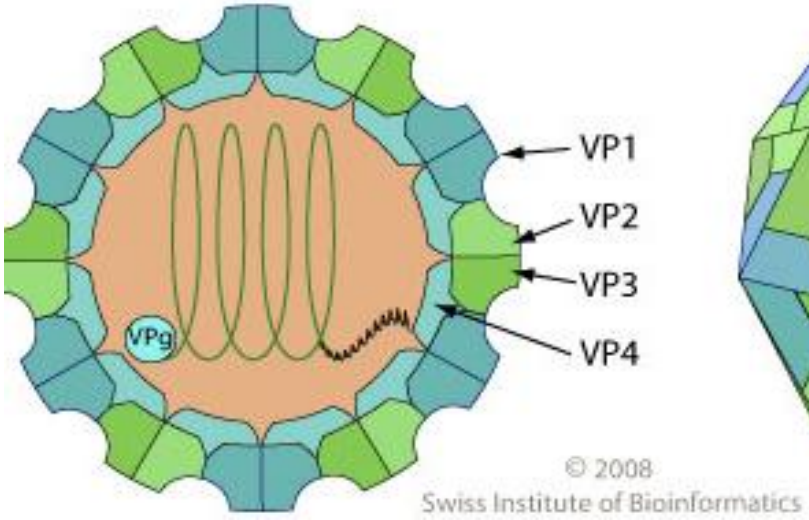
•***Les tremovirus*** : Avian encephalomyelitis virus

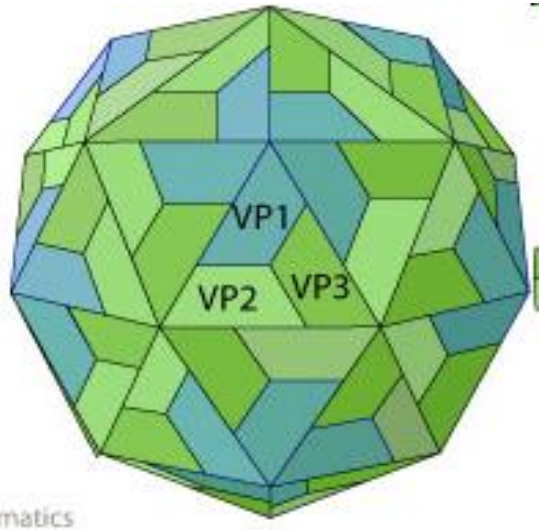
•***Les avihepatovirus :*** Duck hepatitis A virus

STRUCTURE

24 nm de diamètre





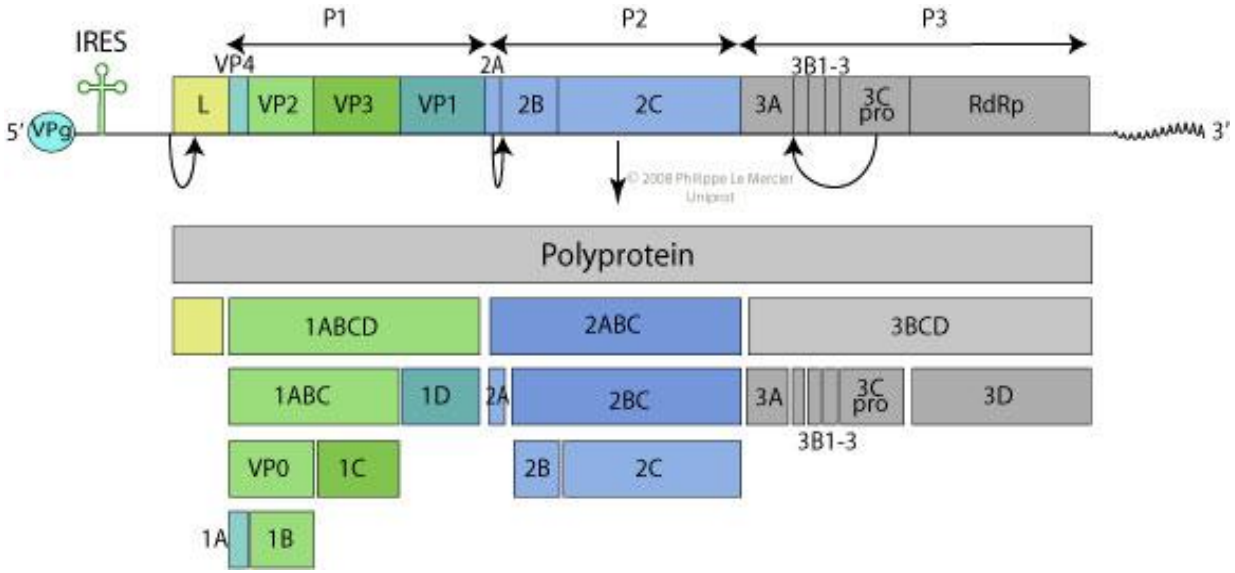


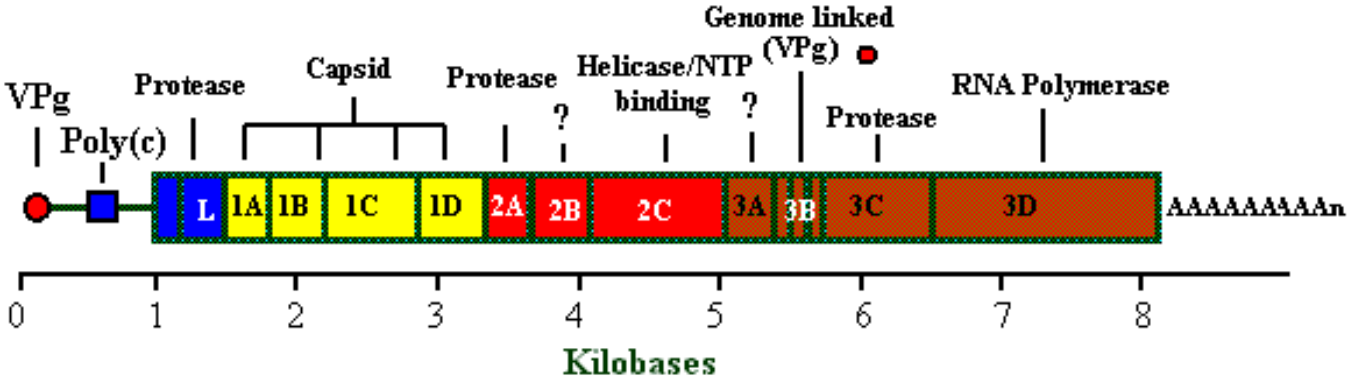
VP1 **VP2** **VP3**

Acide labile (inactivé pH < 6-6.8 ou pH > 9, stable à pH 7.2-7.6)

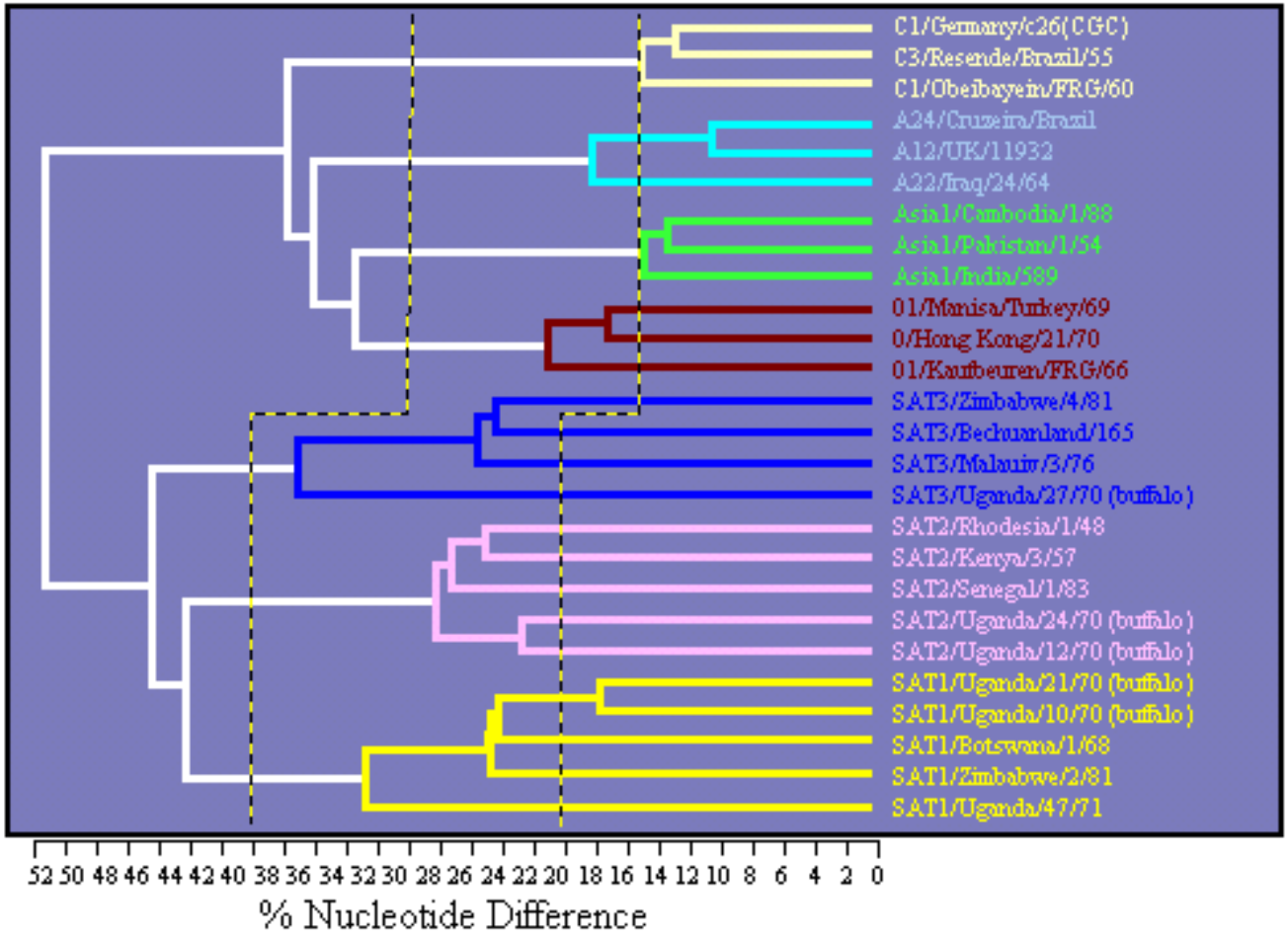
GENOME

ARN simple brin de polarité positive, ~8,5 kb

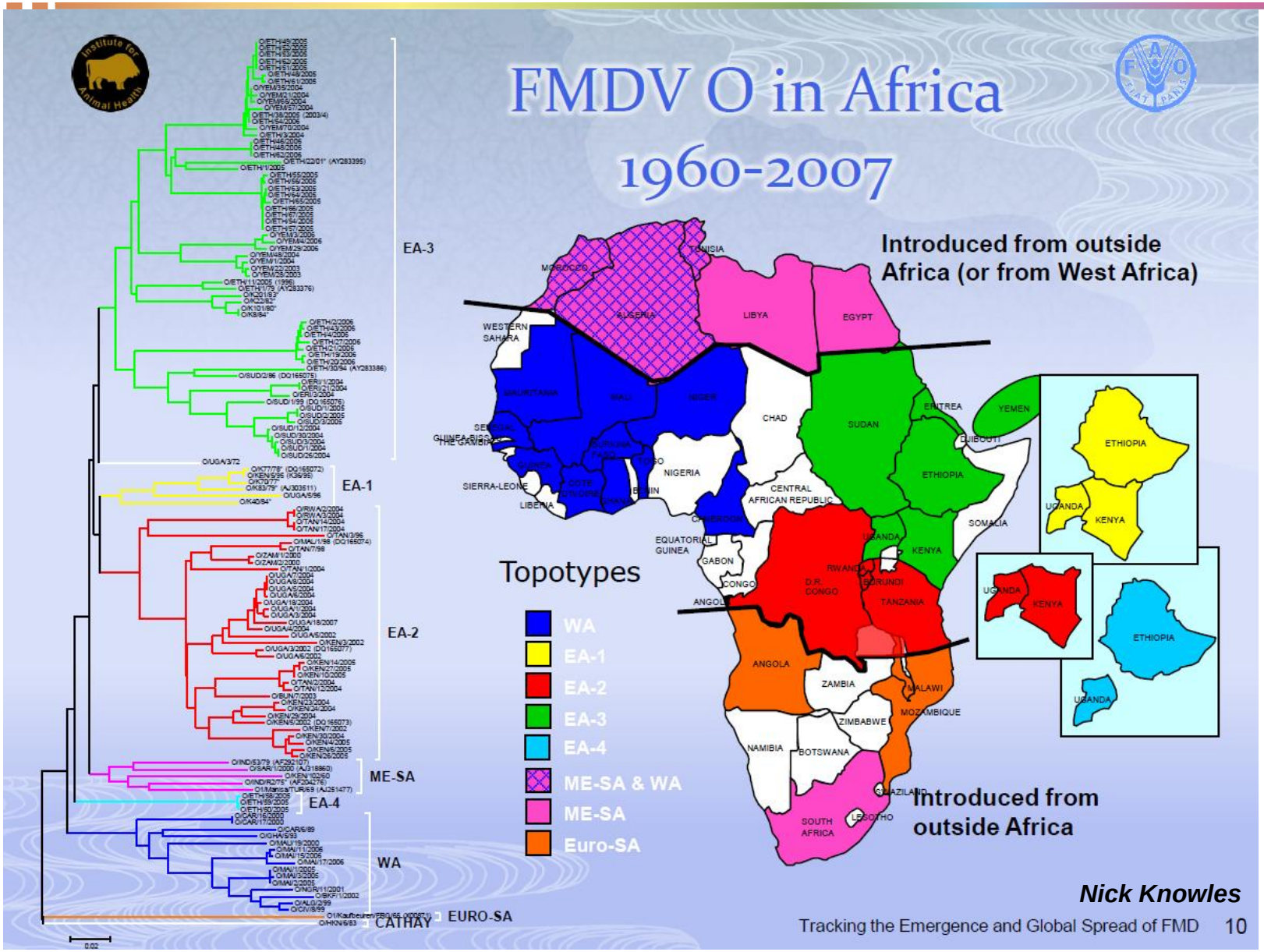




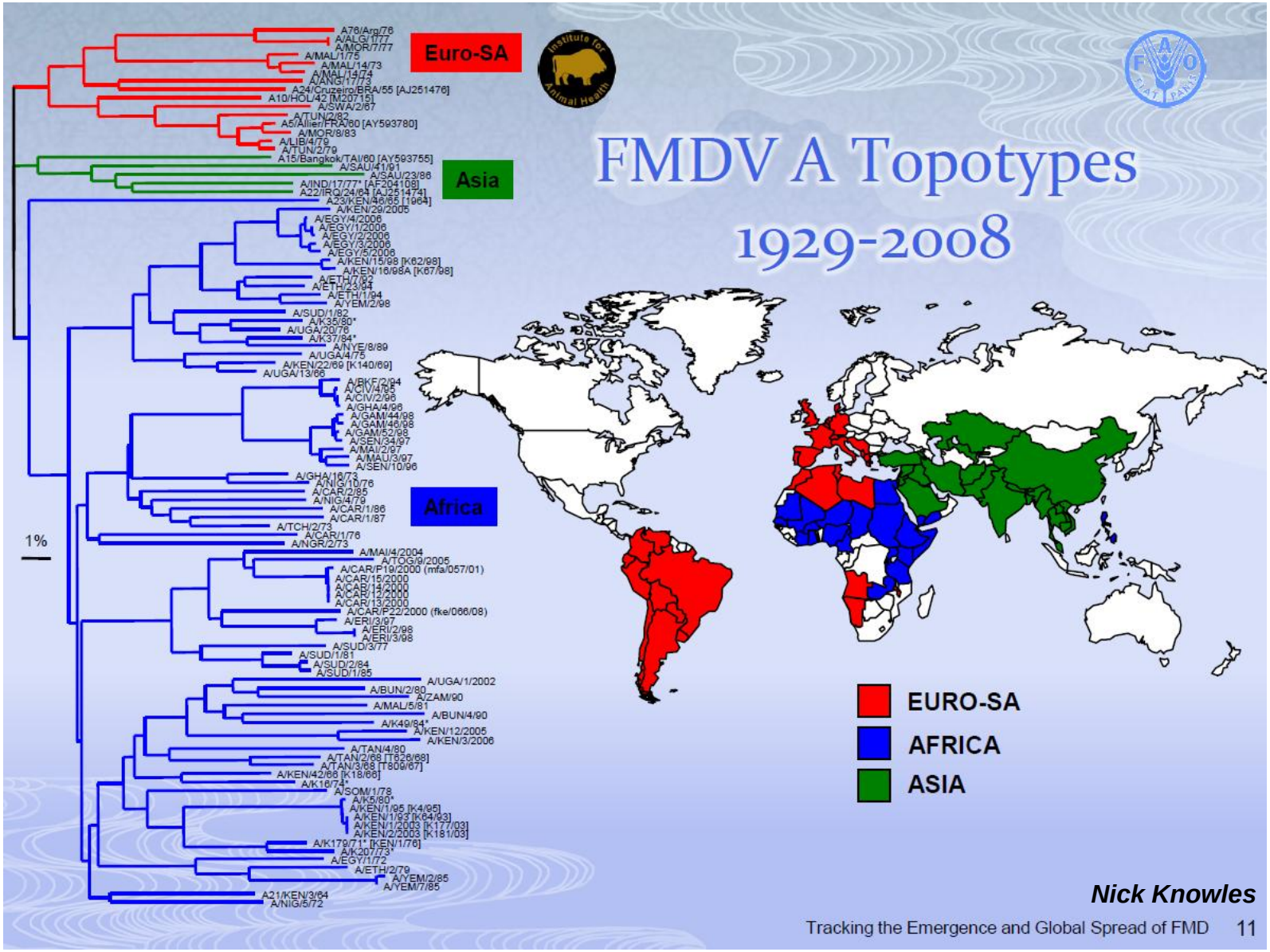
Relations génétiques entre les sept sérotypes de FMDV



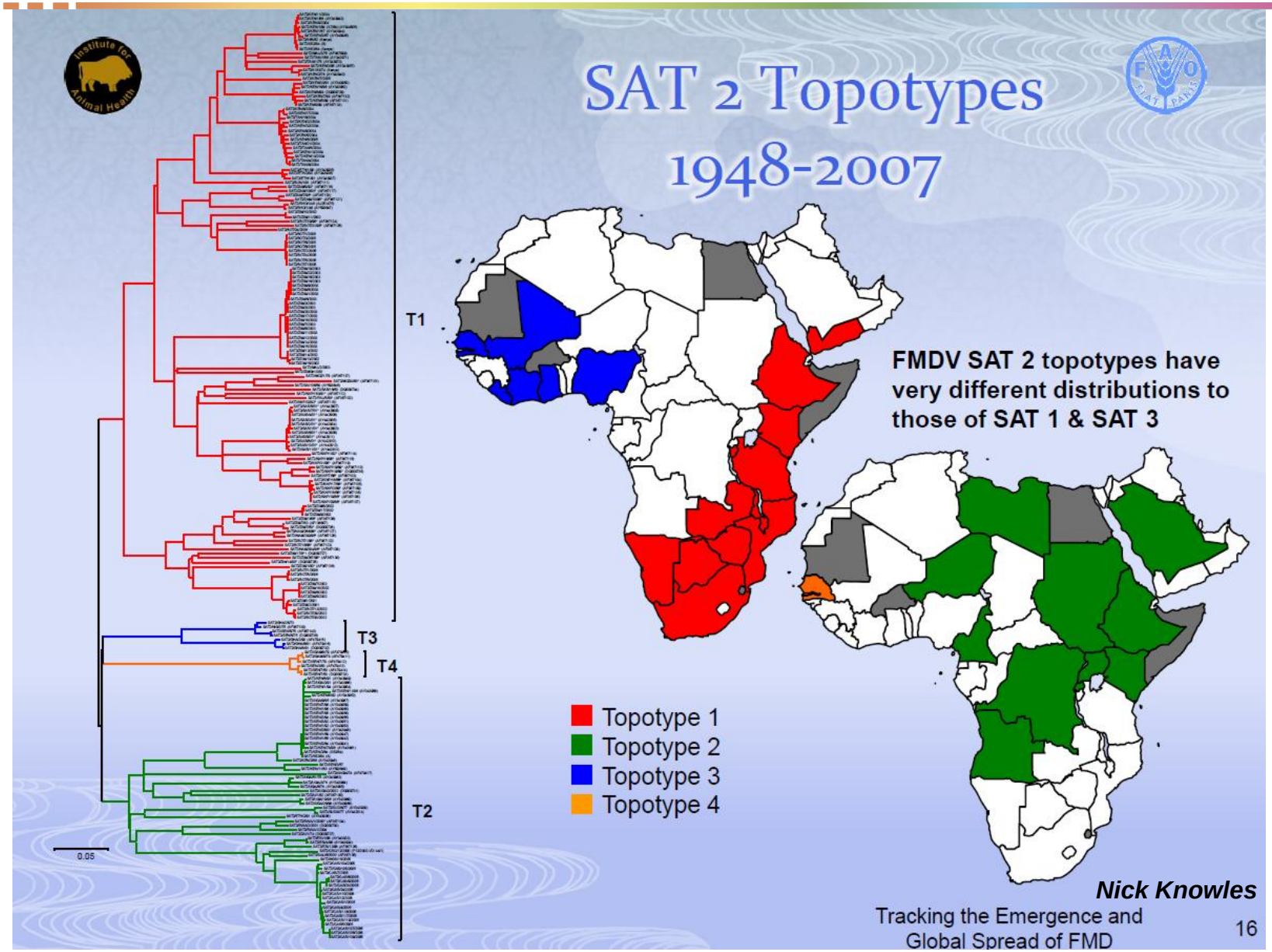
TOPOTYPES Type O



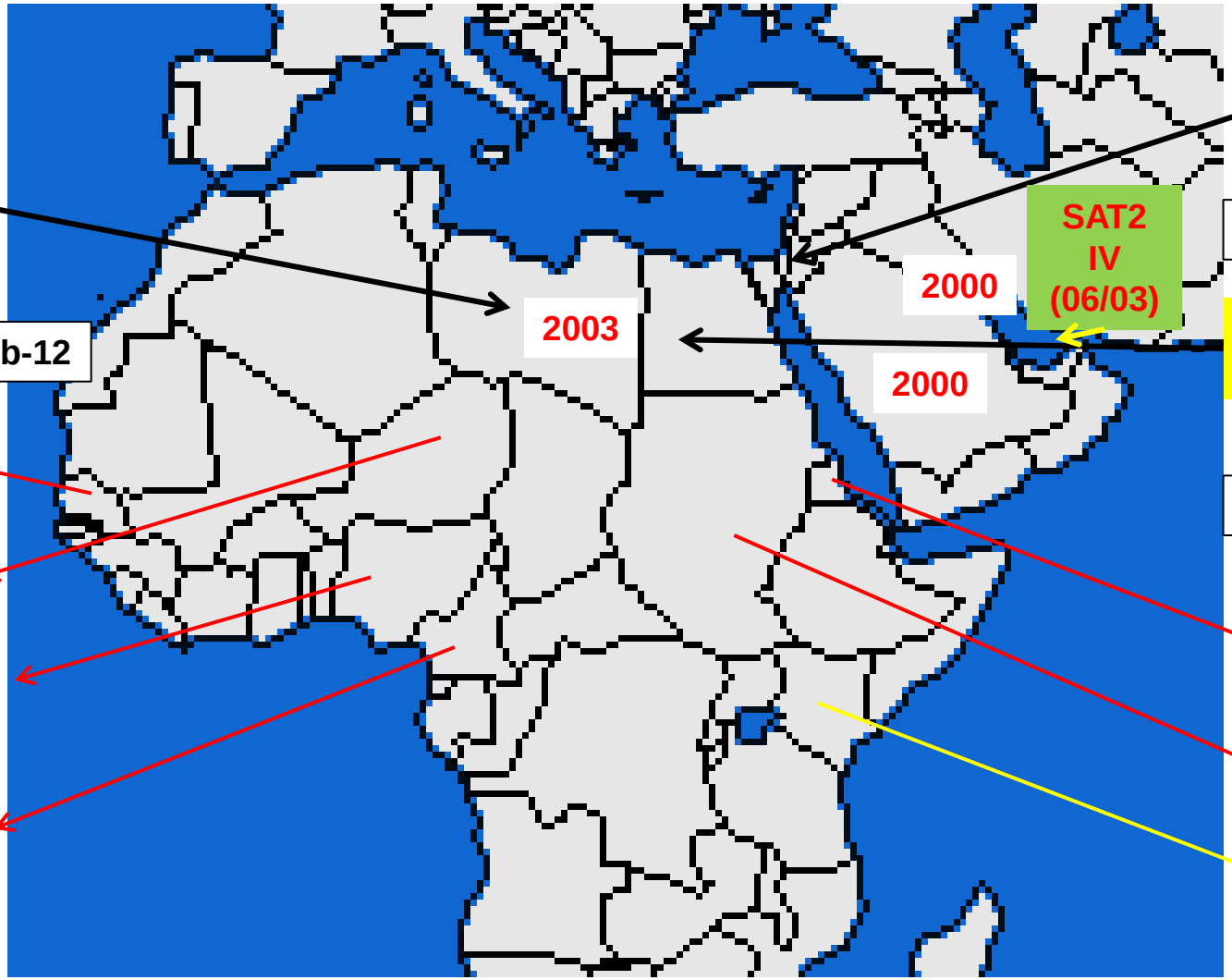
TOPOTYPES Type A



TOPOTYPES Type SAT2



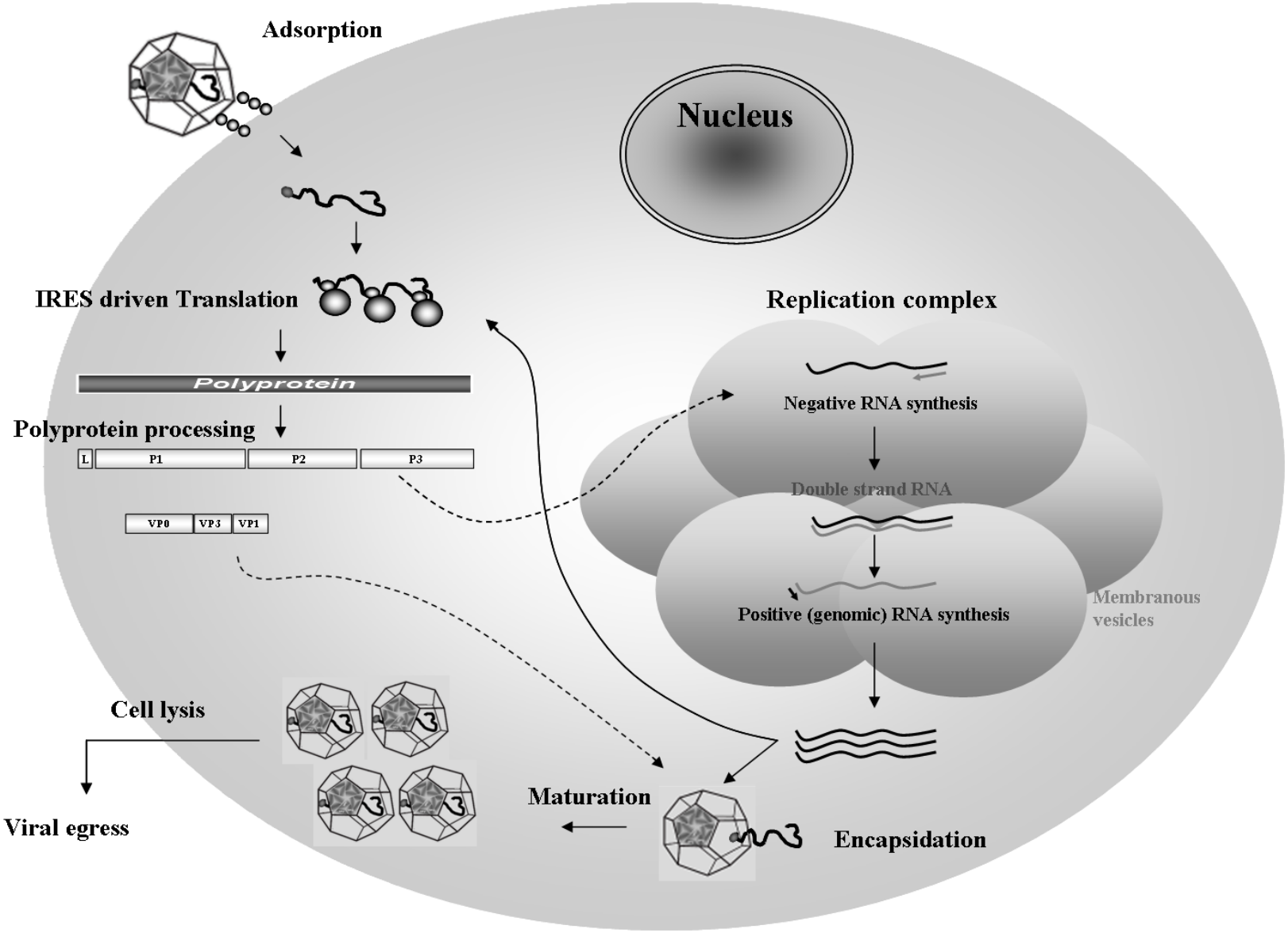
Situation SAT2 actuelle



Similaire Bahreïn 2012

Source http://www.promedmail.org 07/05/2012

Cycle Viral


Adsorption
Nucleus
IRES driven Translation
Replication complex
Polyprotein
Polyprotein processing
L
P1
P2
P3
VP0
VP3
VP1
Negative RNA synthesis
Double strand RNA
Positive (genomic) RNA synthesis
Membranous vesicles
Cell lysis
Viral egress
Maturation
Encapsidation

STABILITE DU VIRUS

- **pH:** inactivé **< 6.8** **pH** **>11**.
  Optimal: pH: 7.2 à 7.6

pH	Survie
2	1 min
4	2 min
5.5	30 min
5.8	18 h
11	2 h
12	2.5 min
13	2.5 min

- **Température**

Température	Survie
4	1 année
22	8-10 semaines
37	10 jours
56	<30 min

STABILITE DU VIRUS

Environnement

Dépend du pH, température, humidité et concentration initiale

- Jusqu'à 20 semaines dans le foin/paille ou jusqu'à 4 semaines sur les poiles de la vache à 18-20C
- 14 jours dans les selles sèches, 39 jours dans les urines et jusqu’à 6 mois dans le lisier en hiver
- 3 jours dans le sol en été et 28 jours en automne

STABILITE DU VIRUS

Viande

- Inactivation dans la viande de carcasses soumise au processus normal d'acidification post-abattage.
- Conserve son infectiosité pendant de longues périodes dans les ganglions lymphatiques congelés ou réfrigérés, la moelle osseuse, et dans les caillots sanguins résiduels et pour des périodes plus courtes dans les abats.
- Peut rester viable pendant de longues périodes dans différents produits de viande salée ou marinée non traitée par acidification.

STABILITE DU VIRUS

Lait

- Peut être présent et rester viable pendant de longues périodes dans le lait non pasteurisé. Il peut aussi rester longtemps viables dans les produits laitiers qui n'ont pas été correctement pasteurisé, y compris la caséine et certains fromages.
- Dans le lait et les produits laitiers, le virion est protégé et peut survivre à des températures de 70C pendant 15 secondes et un pH de 4,6.
- Chauffage du lait contaminé à T° entre 100C et 138C pendant 2-3 secondes n'inactive pas l'infection, mais aucun virus ne peut être détecté par inoculation à l'animal, après traitement à 148 º C pendant 2-3 secondes.

STABILITE DU VIRUS

Semence

Il peut survivre presque indéfiniment dans la semence congelée et conservée pour l'insémination artificielle

DESINFECTANTS

Inactivé par:

- **Hydroxyde de sodium (2%)**
- **Carbonate de sodium (4%)**
- **Acide citrique (0.2%)**
- **Acide acétique (2%)**
- **Hypochlorite de sodium (3%)**
- **Peroxymonosulfate de potassium/chlorure de sodium (1%)**
- **Dioxyde de chlore**
- **Formaldehyde (4%)**

CONTRÔLE DE LA FIÈVRE APHTEUSE

Protection de la santé animale est basée sur un système double:

- Mesures de prévention basées sur surveillance et protection des fermes,
- Lutte contre la maladie avec des plans d'urgence en cas de crise.

CONTRÔLE DE LA FIÈVRE APHTEUSE

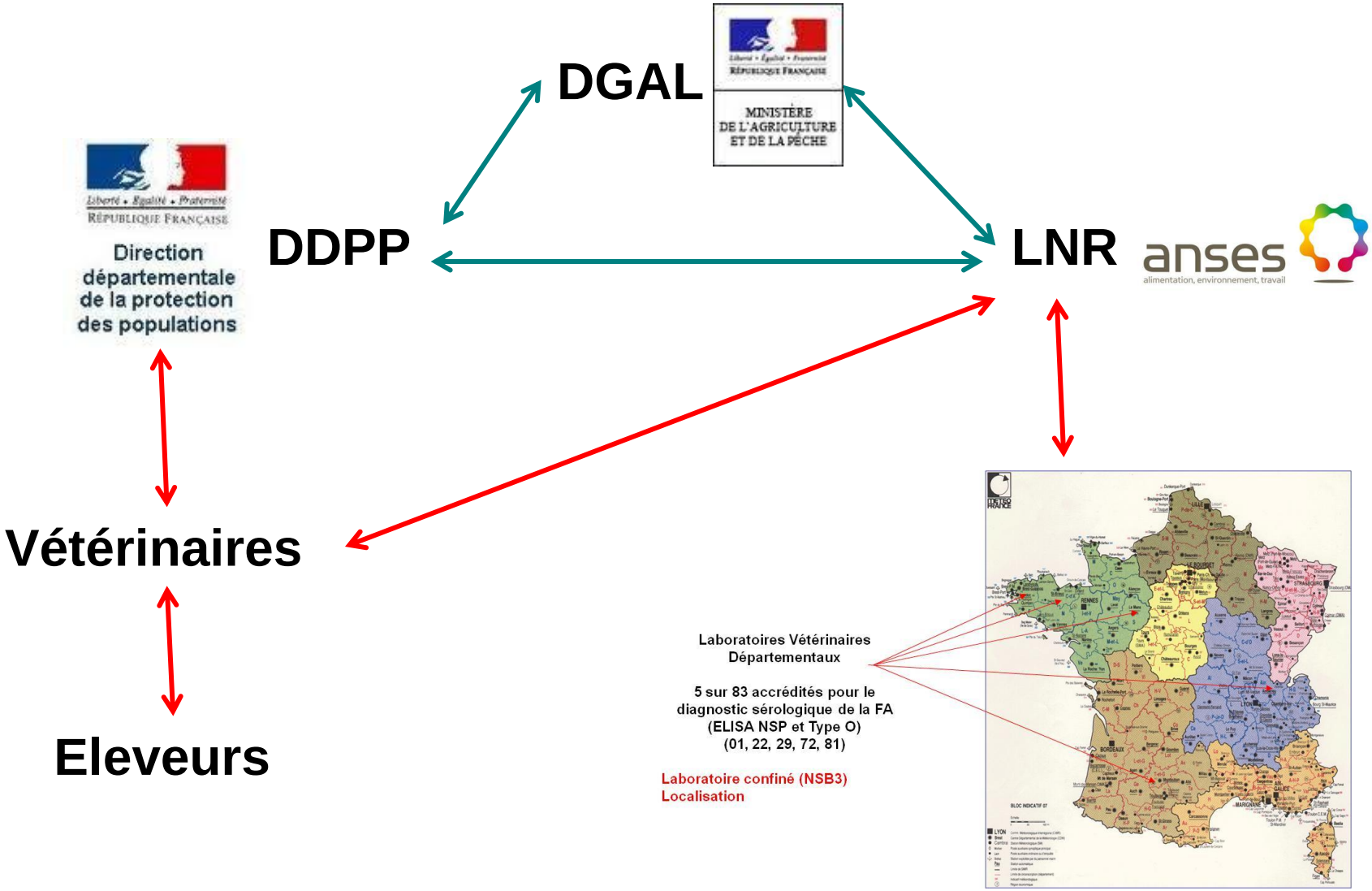
Objectifs

- Empêcher le virus d'entrée sur le territoire
- Détecter et diagnostiquer rapidement la maladie
- Mettre en place rapidement les mesures de lutte et gestion des foyers

Plusieurs acteurs: éleveurs, vétérinaire, services vétérinaires, laboratoires d'analyse, autorités sanitaires, services douaniers

- **Réseau de surveillance et de contrôle**
- **Actions collectives et coordonnées**
- **Actualisation et maintien du système (compétences, efficacité et réactivité doivent être renforcées et entretenues régulièrement)**

Dispositif français de lutte contre la fièvre aphteuse



DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE

Basé sur les données épidémiologiques et cliniques

- Hautement contagieuse
- Fièvre: température rectale jusqu'à 41° C
- Animal triste, déprimé et anorexique
- Baisse de la production de lait chez les vaches laitières
- Ecoulement nasal (séreux et devient muco-purulent)
- Formation des vésicules
  - ✓ Bouche ☞ +/- salivation

    (examen: gencive, gencives, la langue, cavité buccale et les narines)
  - ✓ Pieds ☞ +/- boiterie

    (examen: y compris la bande coronaire, l'espace interdigital, les bulbes de talon)
  - ✓ Glandes mammaires
- Mortalité chez les animaux jeunes en raison d'une myocardite suraiguë

DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

Difficile avec d'autres maladies vésiculeuses:

- **StomatitisVesicular (VS)**
  Bovins, chevaux et porcs induite par un rhabdovirus (2 sérotypes IND et NJ). Présente sur le continent américain. Homme sensible (zoonose), syndrome fébrile.

- **Maladie Vésiculeuse du porc (SVD)**
  Porcs, induite par un enterovirus. Vésicules principalement sur les pieds, mais parfois sur le museau et d'autres sites. Des foyers ont eu lieu en Europe (Portugal and Italie) et en Asie.

- **Exanthème vésiculeux (VE)**
  Porcs, induite par un calicivirus. Vésicules sur museau, pieds et muqueuse buccale occasionnellement diarrhée, avortement et agalaxie. A eu lieu aux USA de 1932-1956.

→ **Diagnostic de laboratoire**

DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

	FMD	SVD	VE	VS
Bovins	+	-	-	+
Porcs	+	+	+	+
Ovins/Caprins	+	-	-	Rare
Chevaux	-	-	-	+
Humains	Très rare	Rare	-	+

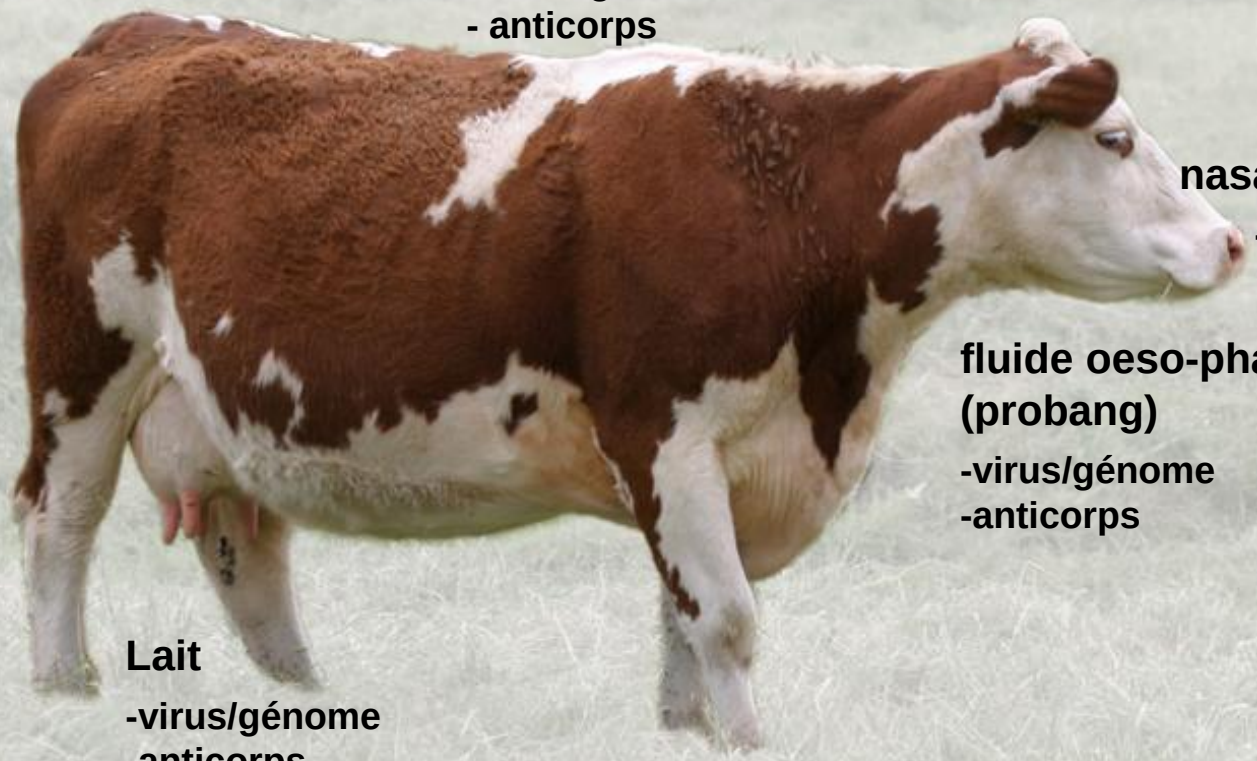
DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

- **Bovin:**
  - Maladie des muqueuses→ ulcération
  - Rhinotrachéite bovine infectieuse→ ulcération
  - Peste bovine →mortalité massive
  - Stomatite papuleuse (parapox) → papules
  - Fièvre catharale maligne → ganglions, kératite
  - « Bovine mamillitis » → trayons seulement
  - Actinobacillose → nodules
- **Porcin:**
  - Nécrobacillose (Fusobacterium nécrophorum) → essentiellement sur les pieds

DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

- Confirmation du diagnostic clinique *(mais sans s'y substituer)*
- La qualité du diagnostic dépend de la qualité des prélèvements adressé pour analyses.
- Requiert une information épidémiologique complète pour pouvoir interpréter les résultats d'analyse.

Prélèvements pour le diagnostic de la Fièvre aphteuse



Sang

- virus/génome
- anticorps

écouvillons nasaux/buccaux

-virus/génome /anticorps

fluide oeso-pharyngé (probang)

-virus/génome
-anticorps

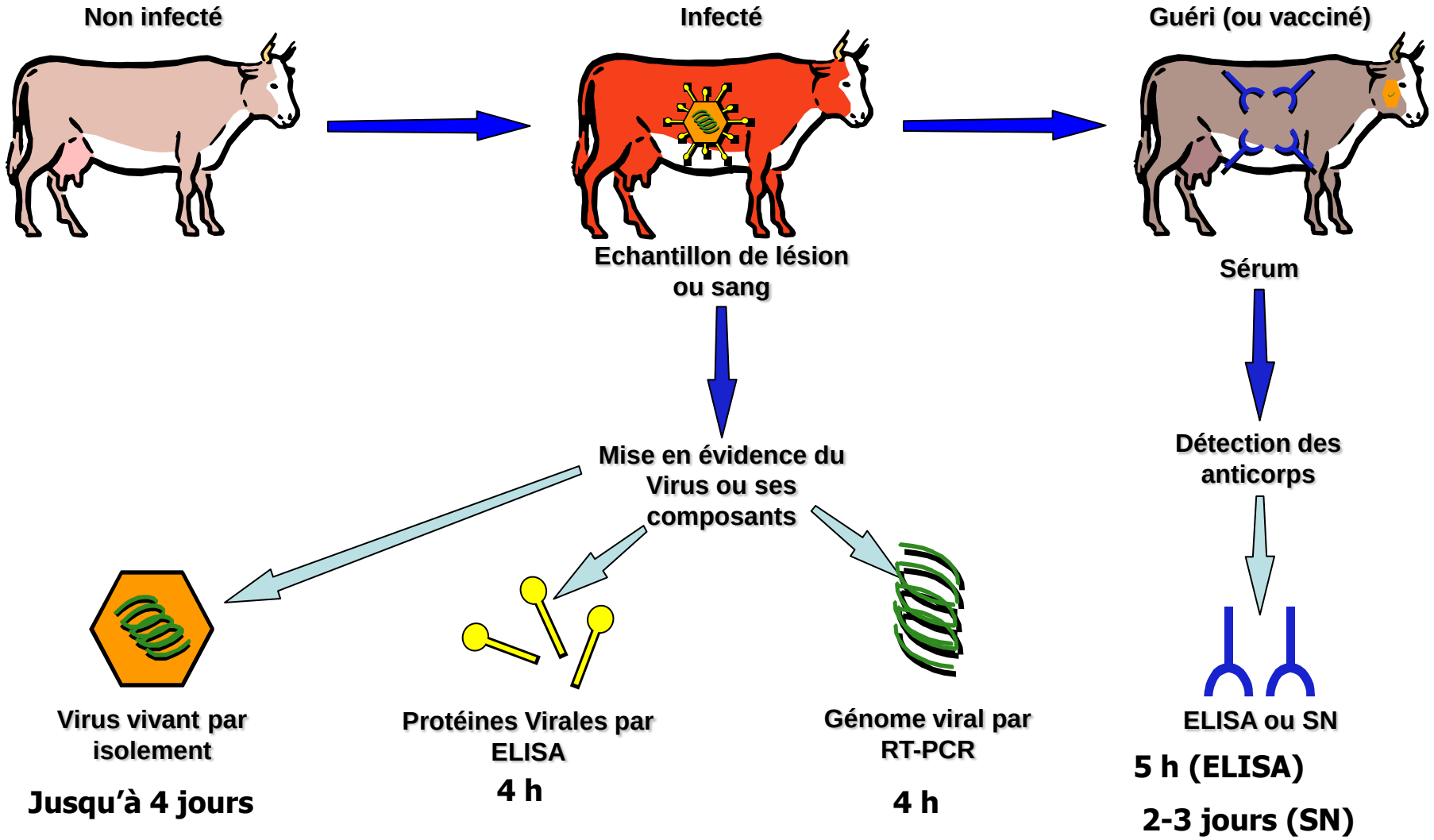
Lait

-virus/génome
-anticorps

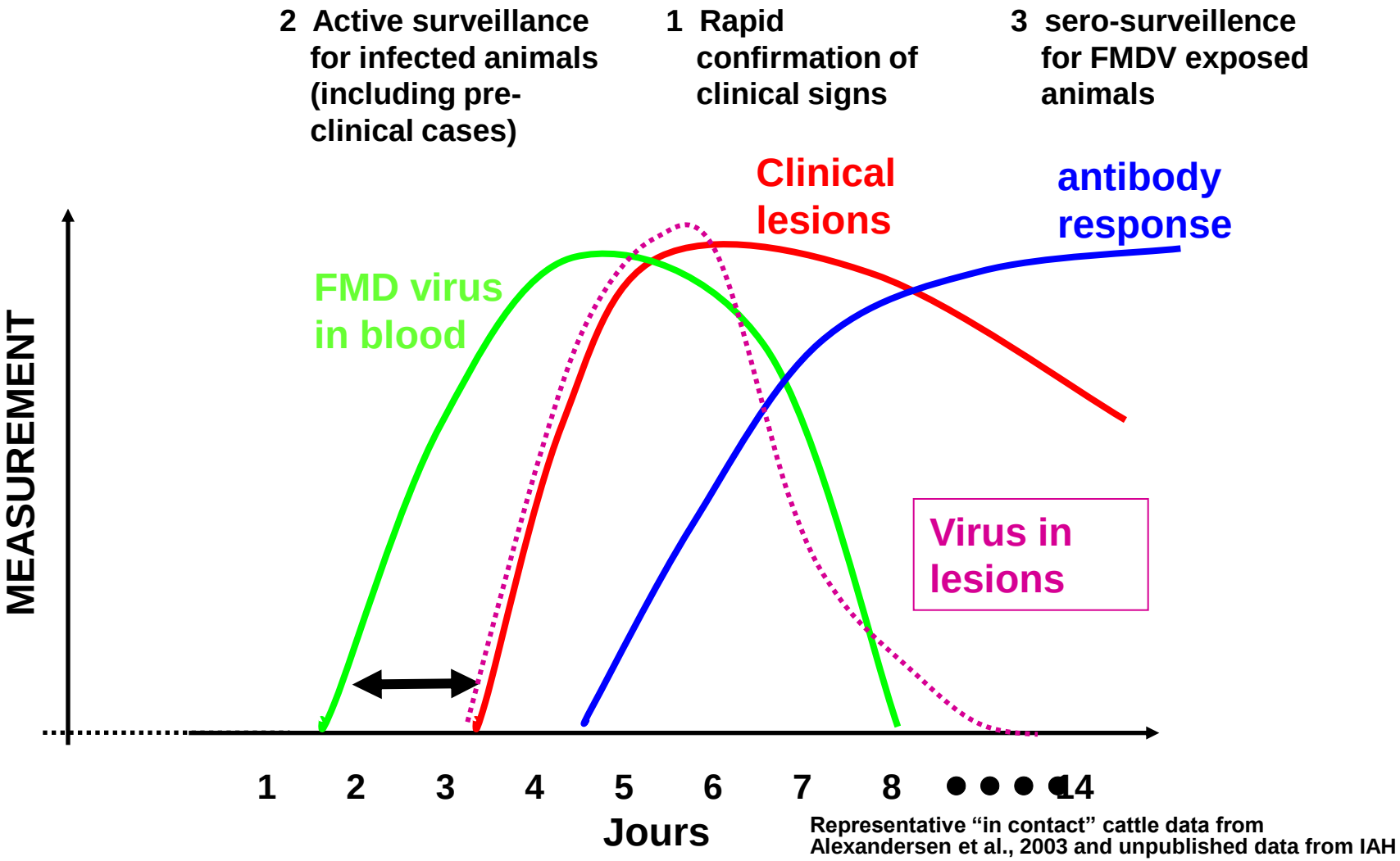
Epithélium/liquide vésiculaire

-virus /génome

Prélèvements pour le diagnostic de la Fièvre aphteuse



Fenêtre de détection par les différentes méthodes



Representative "in contact" cattle data from Alexandersen et al., 2003 and unpublished data from IAH

Méthodes de diagnostic virologique

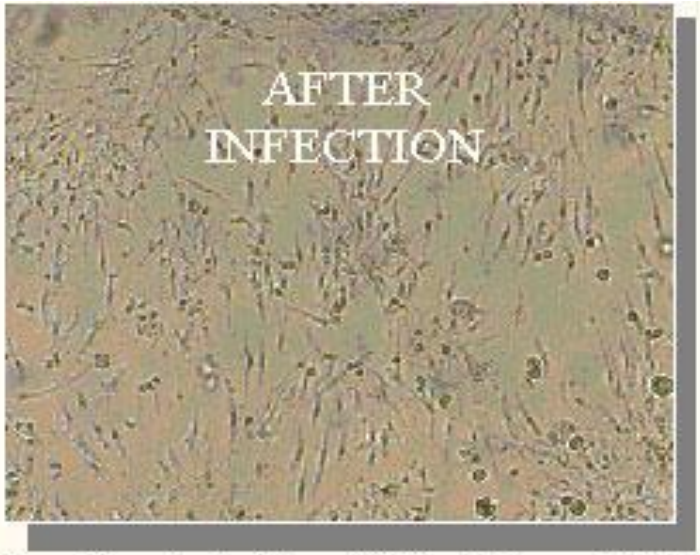
Suspicion ➔ **confirmer ou infirmer l'infection pour prise de décision**

En cas de foyer ➔ **détecter et typer rapidement le FMDV pour mettre en place les mesures adéquates**

Durant une épizootie ➔ **détecter rapidement toute nouvelle introduction et changement de la souche qui circule**

Isolement viral

BTY cells before infection with FMD virus.



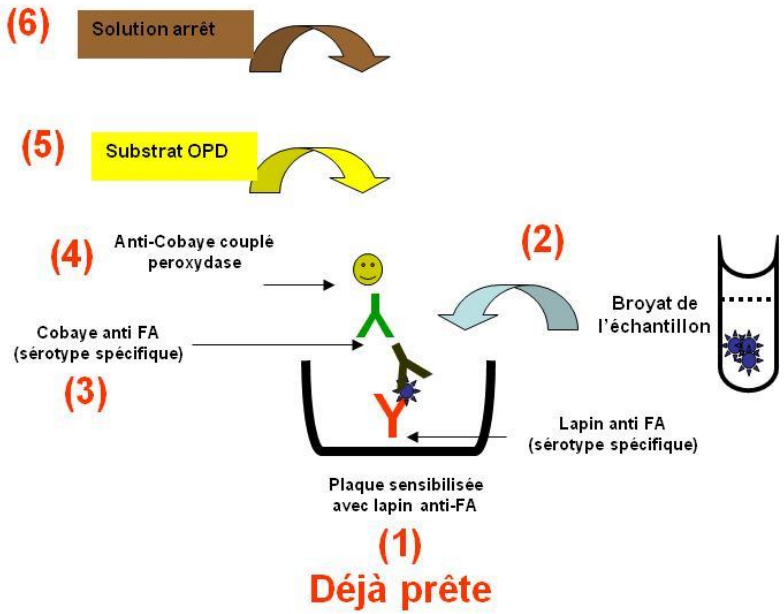
Complete destruction (CPE) of the epithelial cell population is apparent after infection with FMD virus.

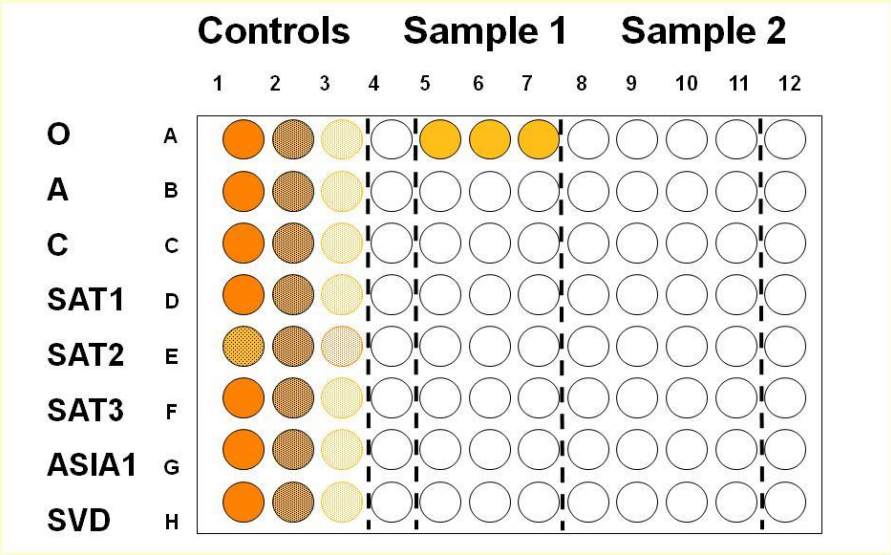
Cellules primaires de thyroïdes de veau et/ou lignée de cellule fœtales de langue de chèvre (ZZ-R, CCLV-RIE 127)

Et

Cellules de rein de porc en lignée continue (lignée IBRS2)

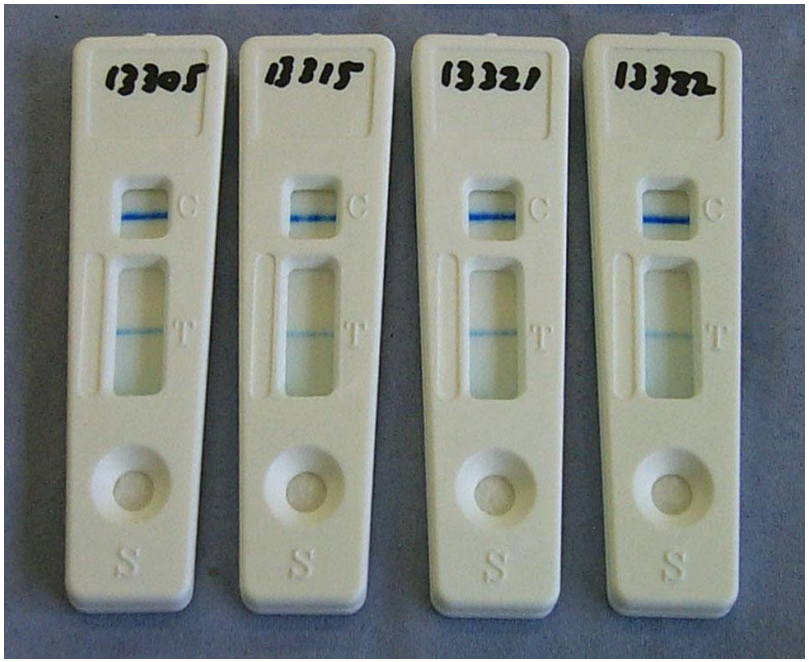
ELISA Ag

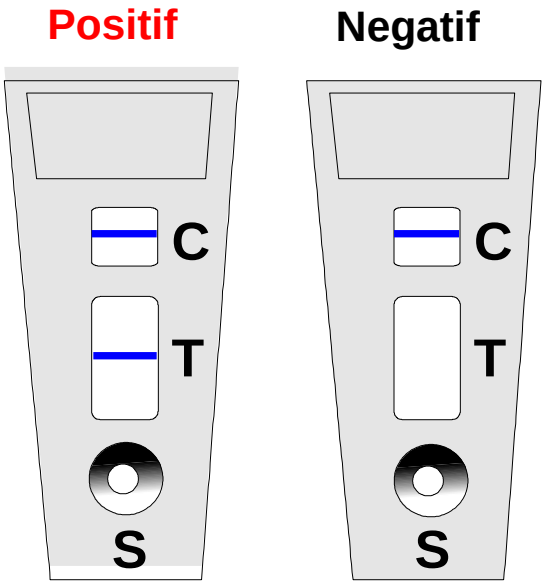

(6)
Solution arrêt
(5)
Substrat OPD
(4)
Anti-Cobaye couplé peroxydase
(2)
Broyat de l'échantillon
Cobaye anti FA (sérotype spécifique)
(3)
Lapin anti FA (sérotype spécifique)
Plaque sensibilisée avec lapin anti-FA
(1)
Déjà prête


Controls
Sample 1
Sample 2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
O A
A B
C C
SAT1 D
SAT2 E
SAT3 F
ASIA1 G
SVD H

Immunodétection sur bandelette

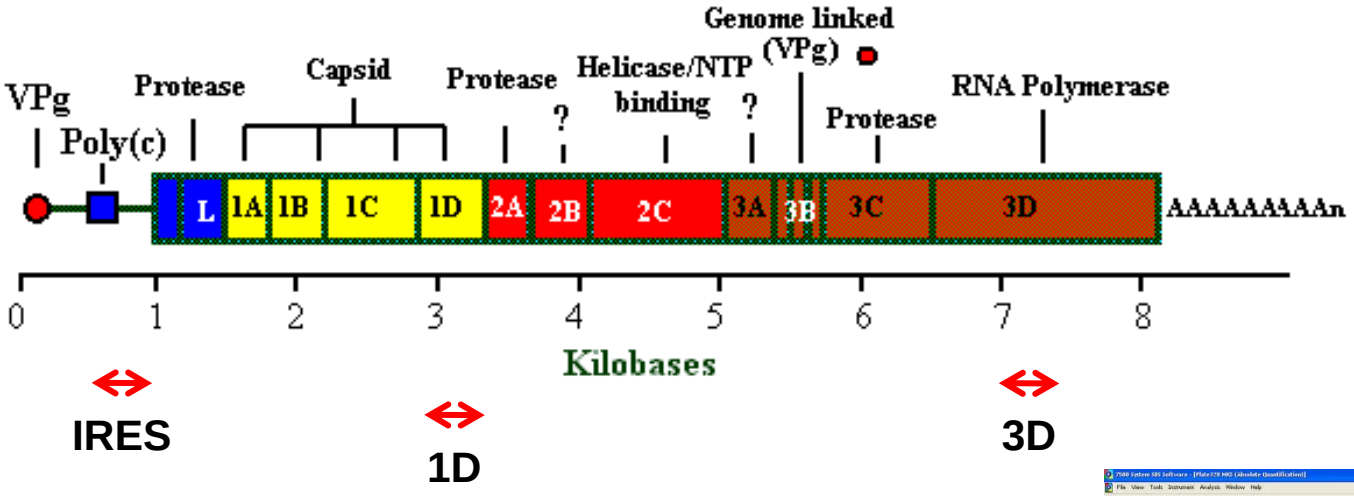
(Lateral Flow Immunoassay)



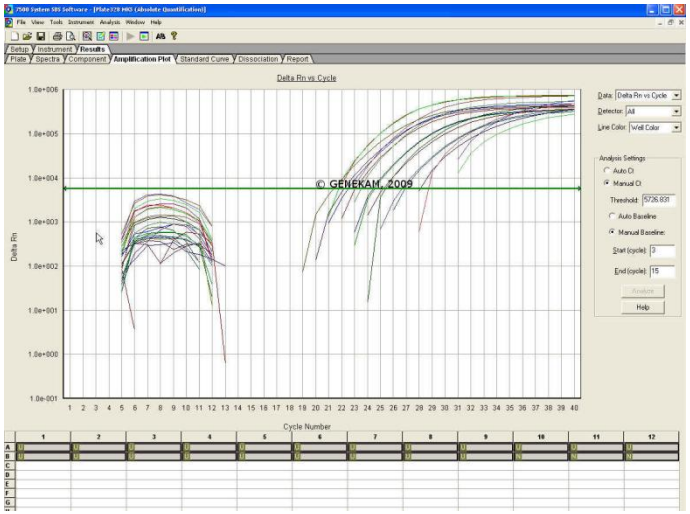


Test rapide: 30mn mais moins sensible et moins spécifique.

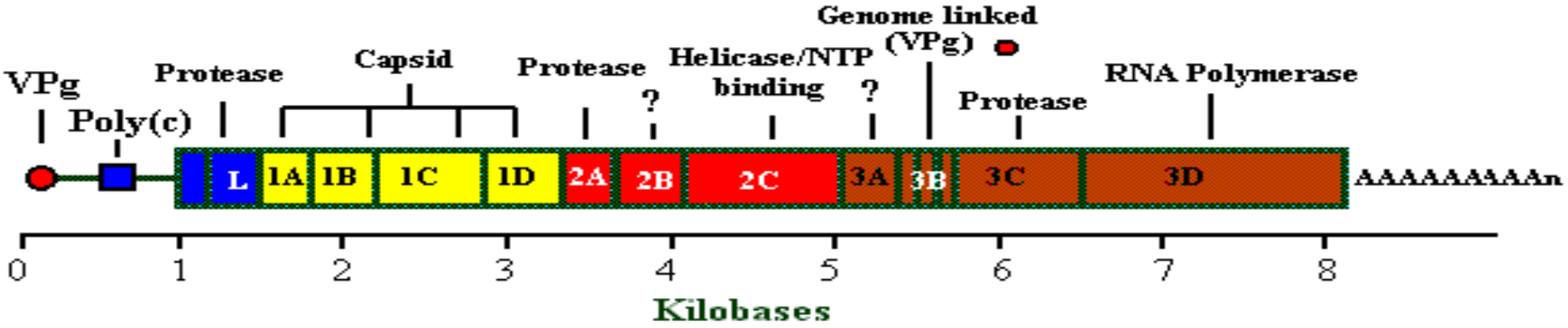
RT-PCR en temps réel



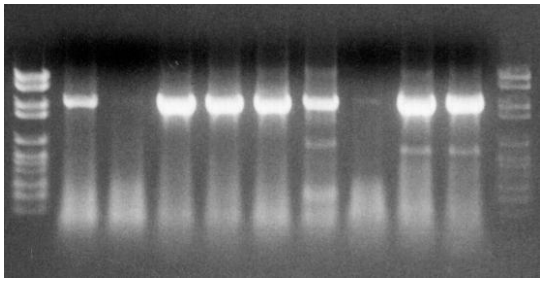
Diagnostic Pan-FA
Typage



RT-PCR classique



- Diagnostic Pan-FA
- Typage
- Séquençage



Méthodes de diagnostic sérologique

1- Certification lors d’import ou d’export

2- Confirmer des cas suspects

3- Confirmer l’absence d’infection

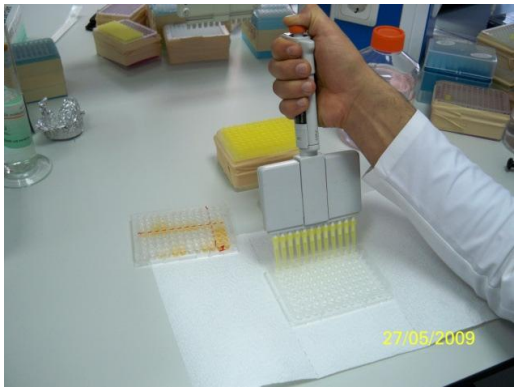
4- Démontrer l’efficacité de la vaccination

Méthodes de diagnostic sérologique

Détection des anticorps contre les protéines structurales

- Anticorps contre les protéines de la capsid
- Anticorps induits suite vaccination ou infection
- Relativement sérotype spécifiques
- Anticorps apparaissent environ 5 jours après infection

- Séroneutralisation
- ELISA de compétition en phase solide
- ELISA bloquante en phase liquide
- ELISA PrioCHECK Type O

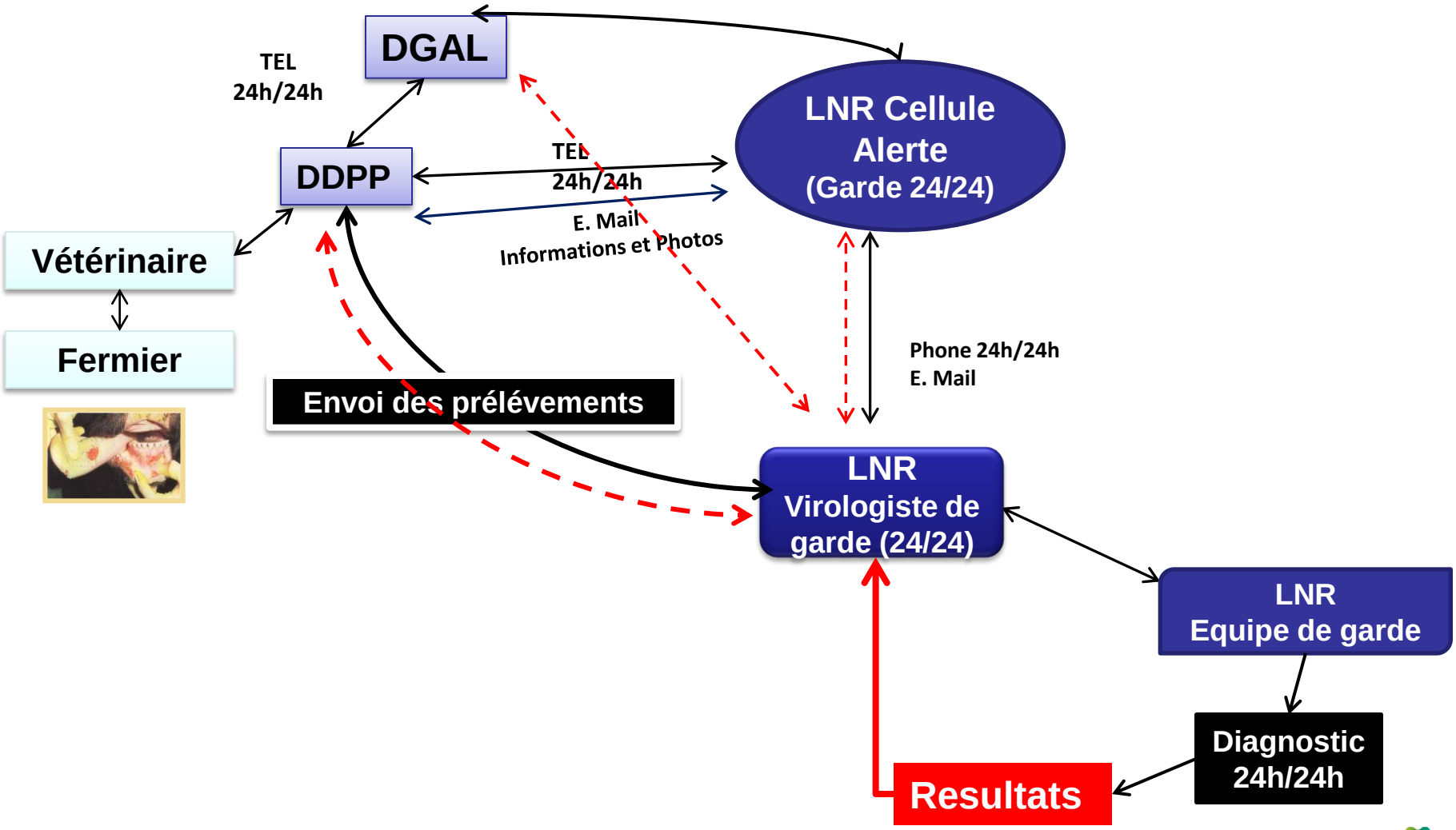


Méthodes de diagnostic sérologique

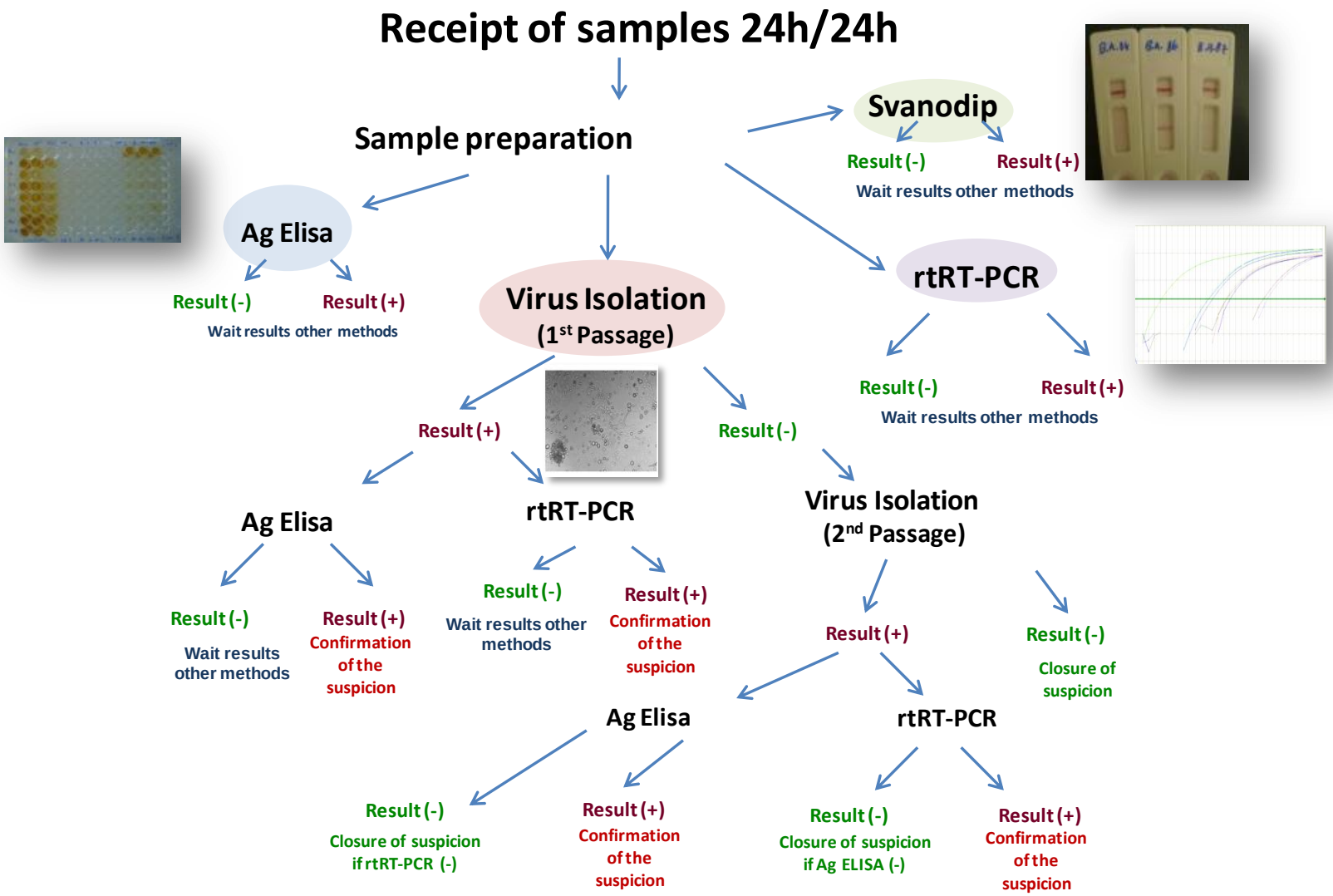
Détection des anticorps contre les protéines non-structurales

- Anticorps contre les protéines impliquées dans la réplication du virus
- Anticorps induits suite à une infection et non une vaccination avec vaccin purifié (peuvent être induits par vaccination multiple)
- Pas spécifique d'un sérotype
- Plusieurs kit commerciaux existent, certains spécifiques de l'espèce d'autres non:
    - PrioCHEK FMDV NS (Ceditest)
    - SVANOVIR FMDV 3ABC-Ab
    - Bommeli
    - UBI
- Anticorps apparaissent environ 7j après infection, généralement dans les 3-4 jours d'apparition de lésions
- Réponse NSP peut être réduite et retardée en cas d'infection subclinique ou légère
- Utilisé pour la sérosurveillance

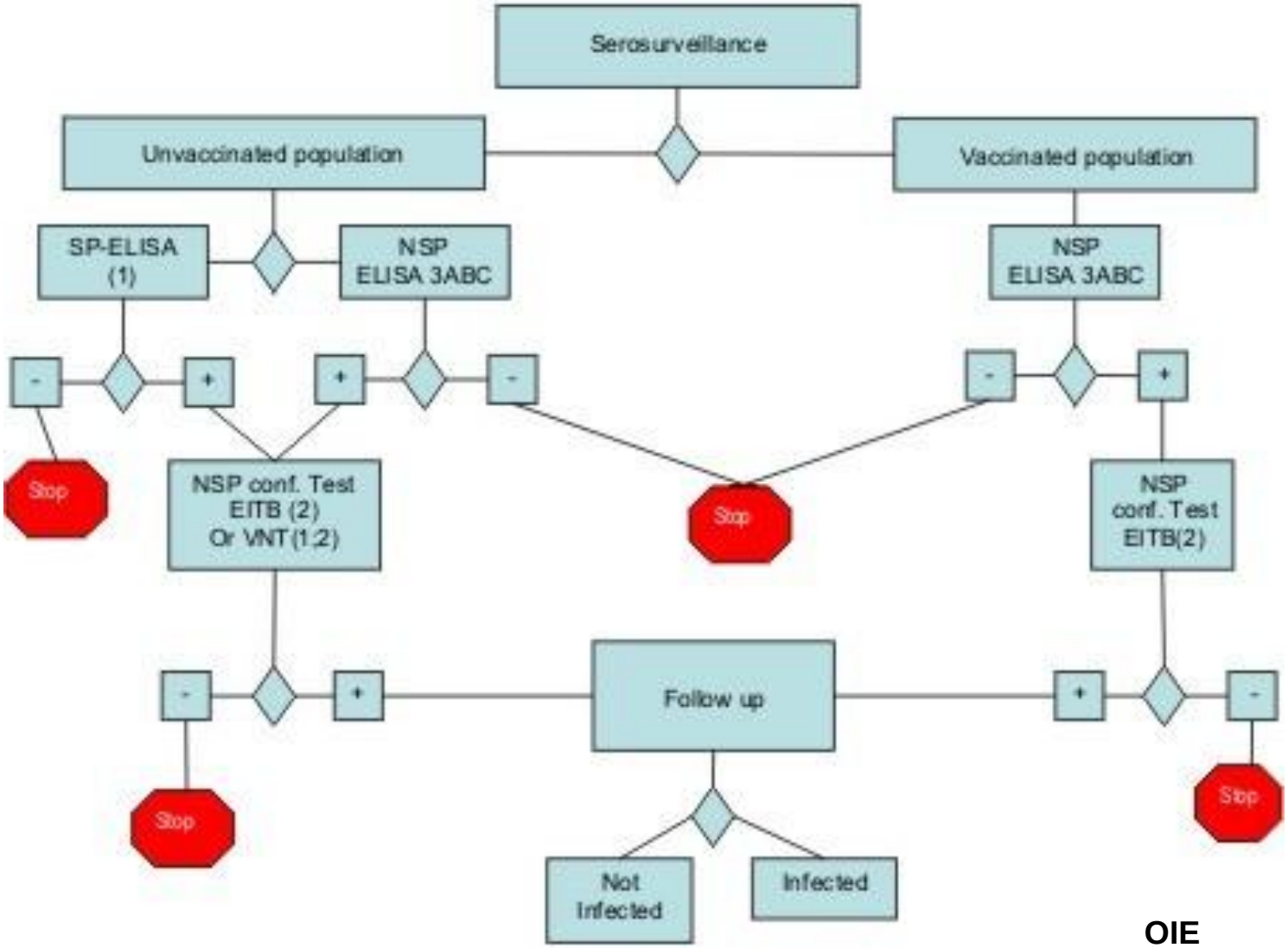
Système d'alerte FA en France



Arbre de décision lors d'une suspicion



Arbre de décision lors de serosurveillance



OIE

Exemple de traitement d'une suspicion

Scénario

Dimanche 06/02/2011, vers 18h, la cellule alerte a reçu un appel de la DDPP des Pyrénées-Orientales pour une suspicion de la FA dans un élevage constitué de 100 bovins. L'épidémiologiste de garde a confirmé la suspicion et a contacté le virologiste de garde à 20h. Celui-ci a contacté immédiatement la DDPP pour organiser l'envoi des prélèvements. La DDPP a prélevé 3 lambeaux d'épithélium à partir d'aphtes observés chez les bovins et les a expédié par route le soir même. Les prélèvements sont arrivés au laboratoire lundi 07/02/2011 à 9h du matin et pris en charge immédiatement par l'équipe.

Traitement des échantillons

Lambeaux d'épithélium/Date et heure de début de traitement : <u>9H15</u>

lèvement	Conditionnement/poids		Poids utilisé	Volume de dilution	Surnageant après centrifugation	Surnageant utilisé	Surnageant stocké
	Sec	Milieu de transport					
	NA	pH : 7,5	0,77g	1/5 + 3,08 ml	NA	2650µl	1350µl
	NA	pH : 7,5	1,05g	1/5 + 4,2 ml	NA	2650µl	430µl
	NA	pH : 7,2	0,50g	1/5 + 2ml	NA	2650µl	0

Heure de fin de traitement : <u>10h25</u>

Date et Heure de fin de traitement : <u>07/02/11 à 10h25</u>

Exemple de traitement d'une suspicion

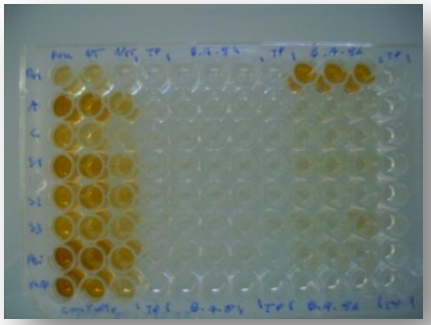
Echantillon (10h25)

Isoalement viral (début 11h)

LFD (Svanodip)(début 10h25)

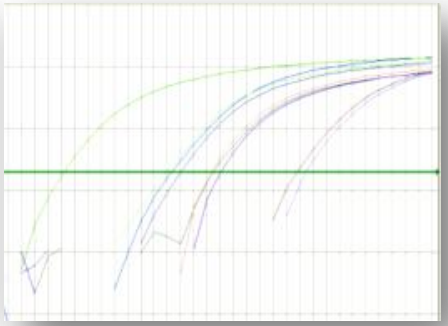
10h35 S1 (+)
10h55 S2 douteux et S3 (-)

Ag ELISA (début 10h45)



14h30 S1 (+) type O , S2 et S3 (-)

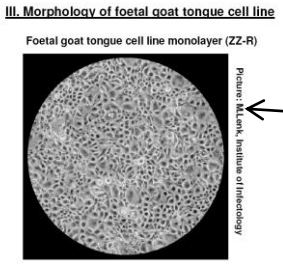
rtRT-PCR (début 10h45)



15h30 les 3 éch (+)

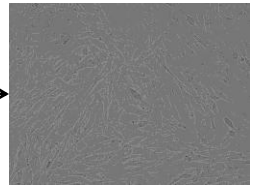
	IRES	3D
S1	25,28	29,02
S2	35,44	28,26
S3	34,77	28,41

Exemple de traitement d'une suspicion



Fœtal goat tongue cell line (ZZ-R 127)

Isolement viral
(début 11h)



Swine kidney cell line (IBRS-2)

	4 PM		6 PM	
	ZZ	IBR	ZZ	IBR
S1	+	-	++	+
S2	-	-	+	-
S3	-	-	+	-

Fin du diagnostic 6 PM

➔ confirmation et typage en ~6 h

Equipe Biopic

Labib
Bakkali Kassimi

Sandra
Blaise Boisseau

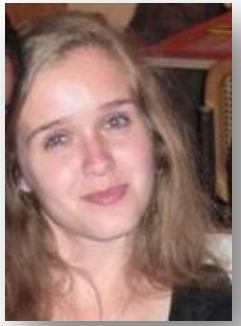
Anthony
Relmy

Kamila
Gorna

Aurore
Romey

Lela Kopliku
Thésarde

Aude Allemandou
Chargée de Projet
CDD 24 mois



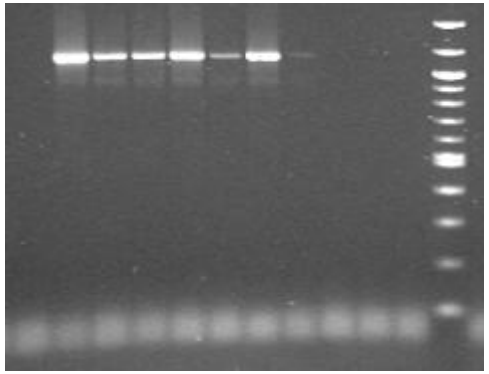
Annabelle GARNIER
CDD 12 mois

L'AMPLIFICATION GÉNIQUE PAR PCR

(Polymérase Chain Reaction)

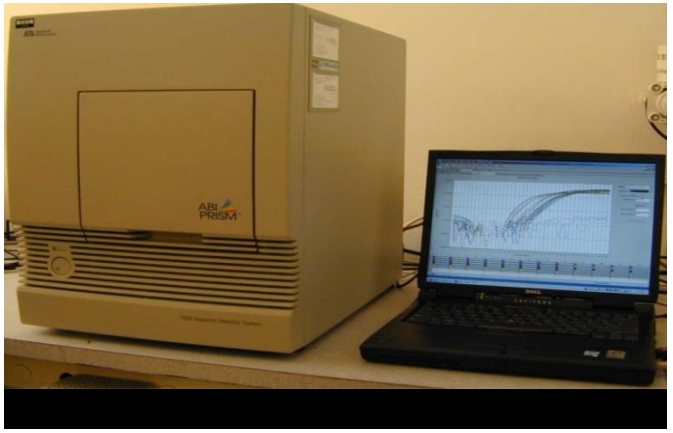
ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC DE LA FIEVRE APHTEUSE

21 mai 2012



Corinne SAILLEAU
Corinne.sailleau@anses.fr

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort



Recherche du génome d'un agent infectieux à partir de

Provenant

etc …

Extraction des acides nucléiques

PCR ou RT-PCR

RT : Reverse-transcription (ARN ⇨ ADNc)

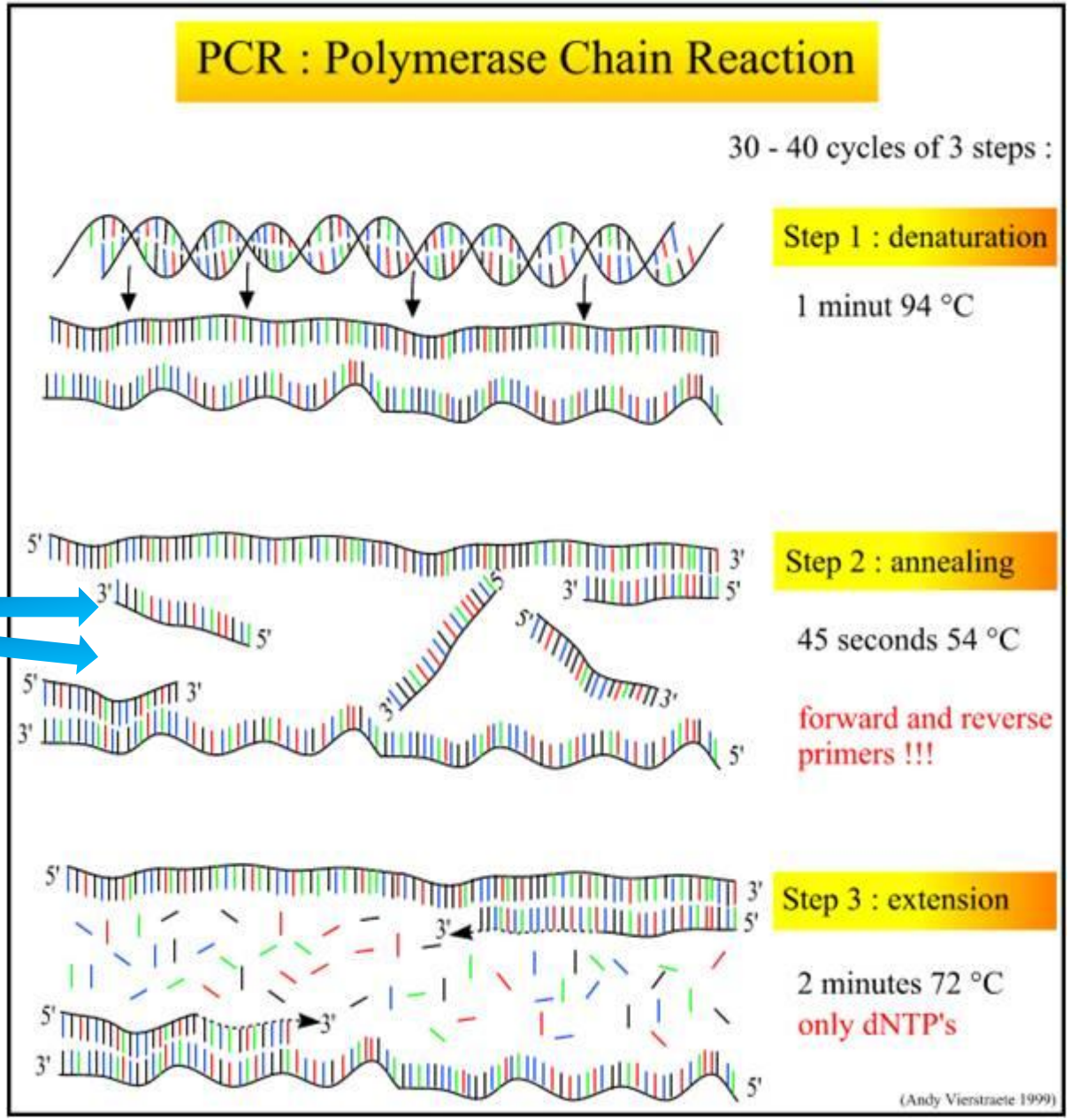
Quels sont les pré-requis pour développer une PCR ?

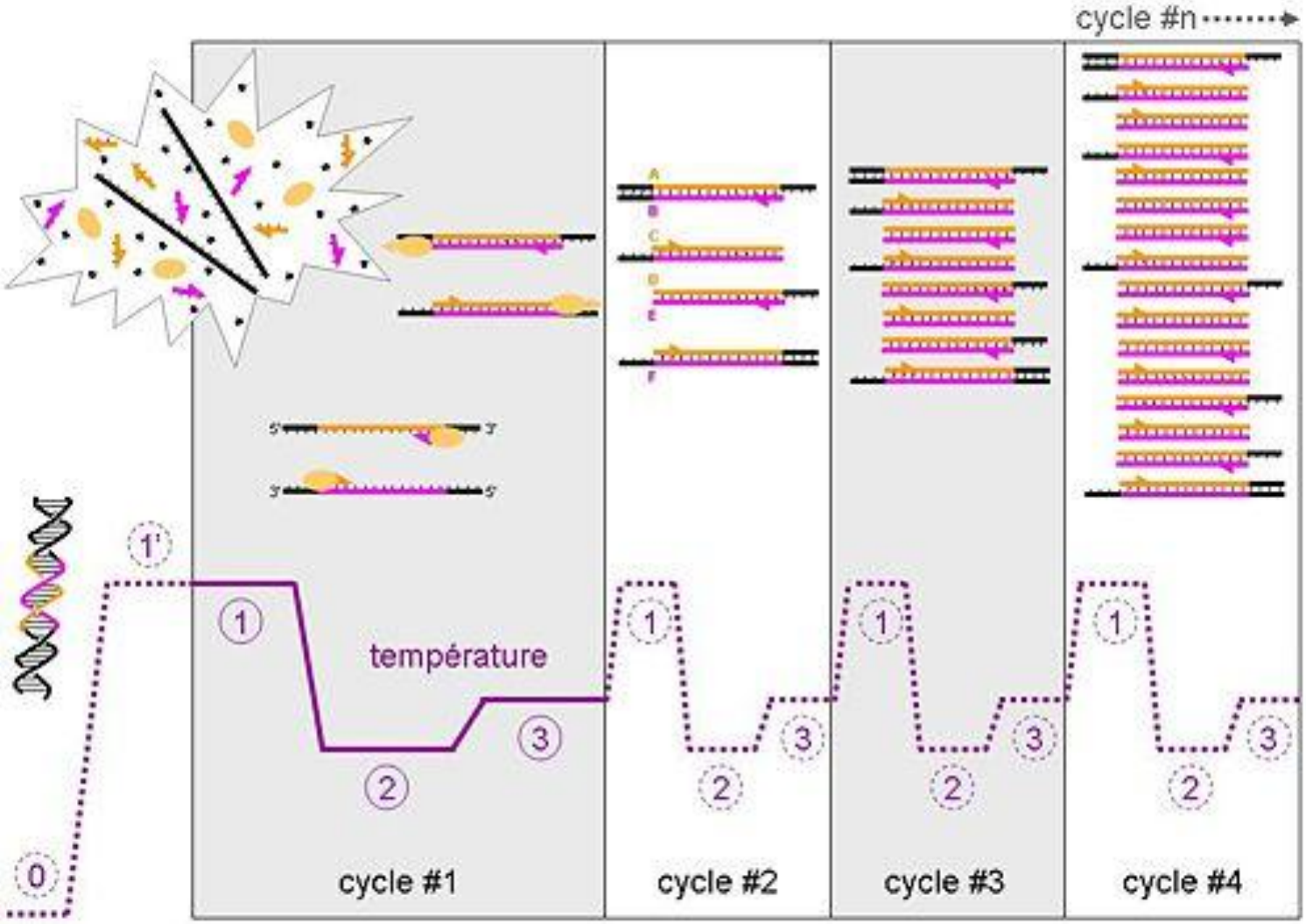
- Sélection du gène candidat
  - Diagnostic tous sérotypes ou spécifique de sérotype
- Connaitre la séquence ou une partie
  - Choix et synthèse des amorces spécifiques
- ADN ou ADNc
  - Utilisation d'une ADN polymérase

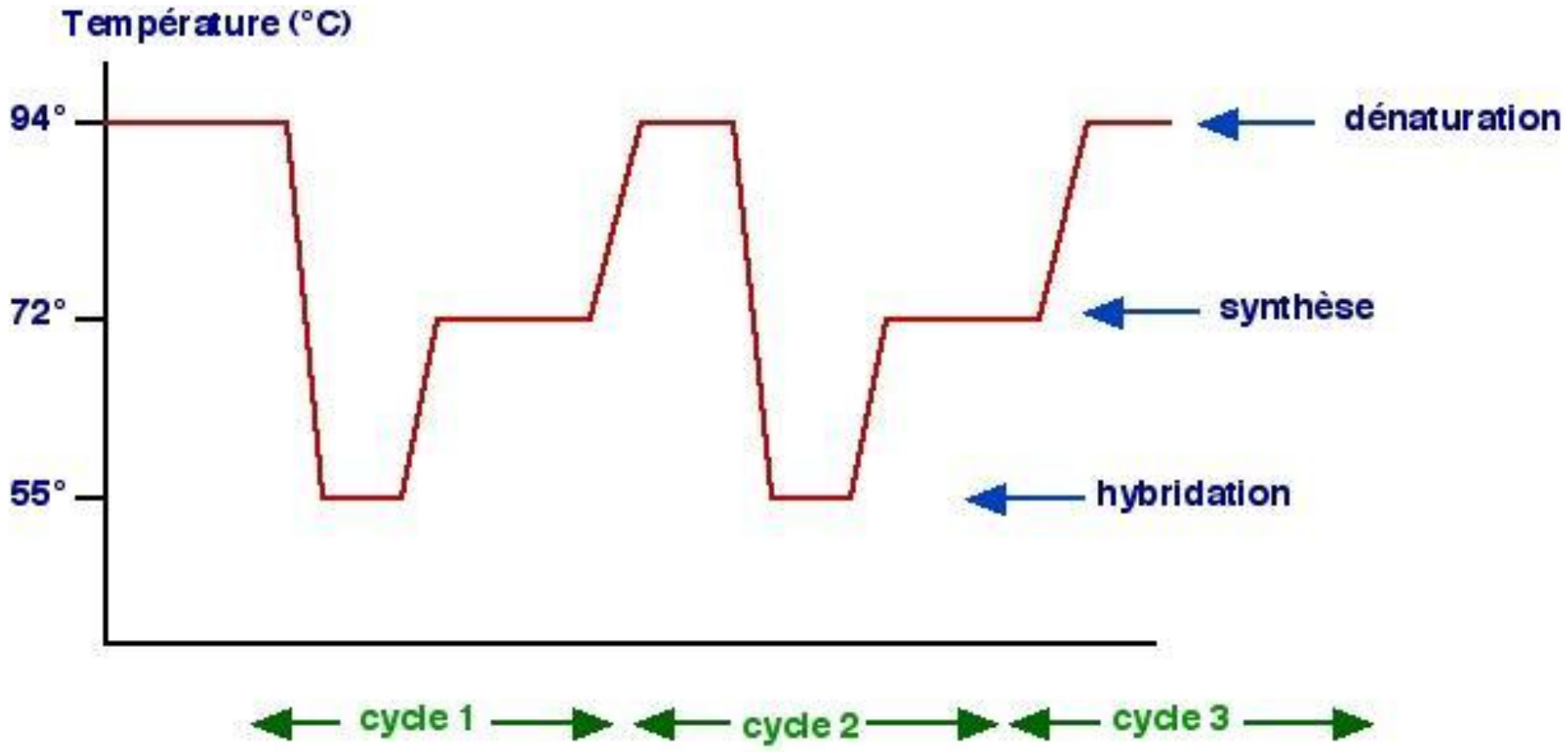
Cible sélectionnée

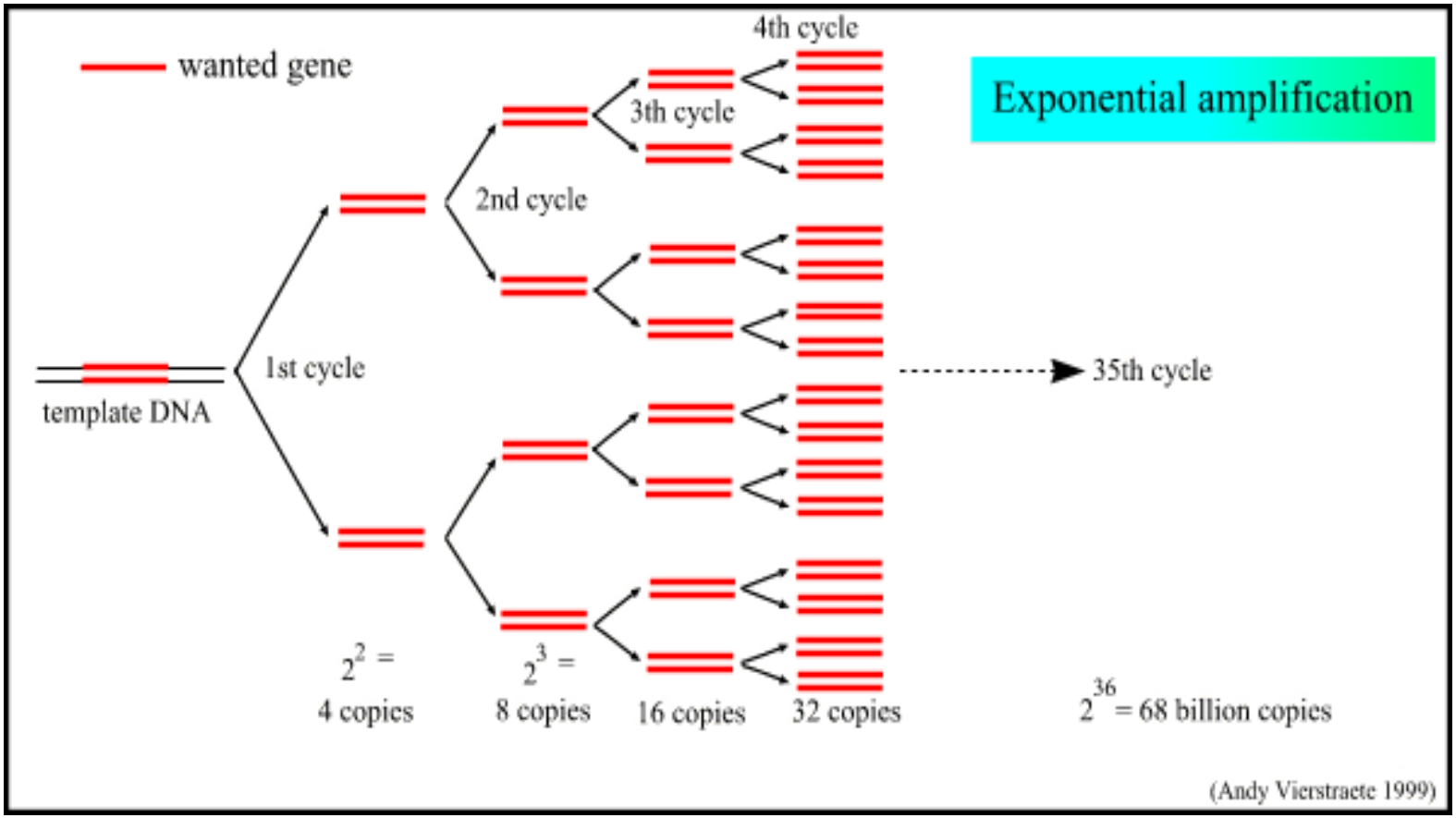
Amorces sélectionnées
Sens et anti-sens

Synthèse de l'ADN
À l'aide de la Taq Polymérase
et de dNTP




cycle #n
température
cycle #1
cycle #2
cycle #3
cycle #4

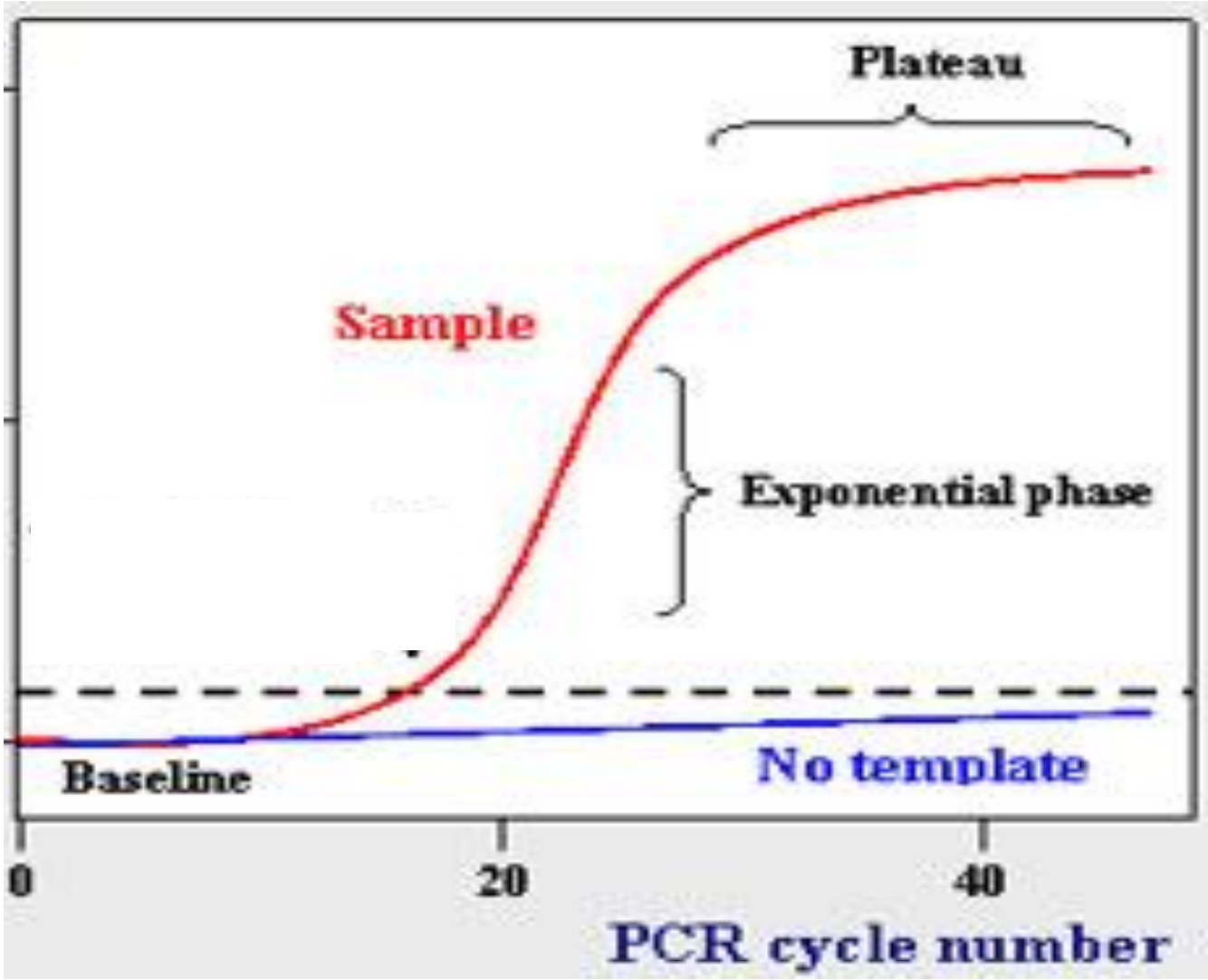

Température (°C)
94°
72°
55°
dénaturation
synthèse
hybridation
cycle 1
cycle 2
cycle 3



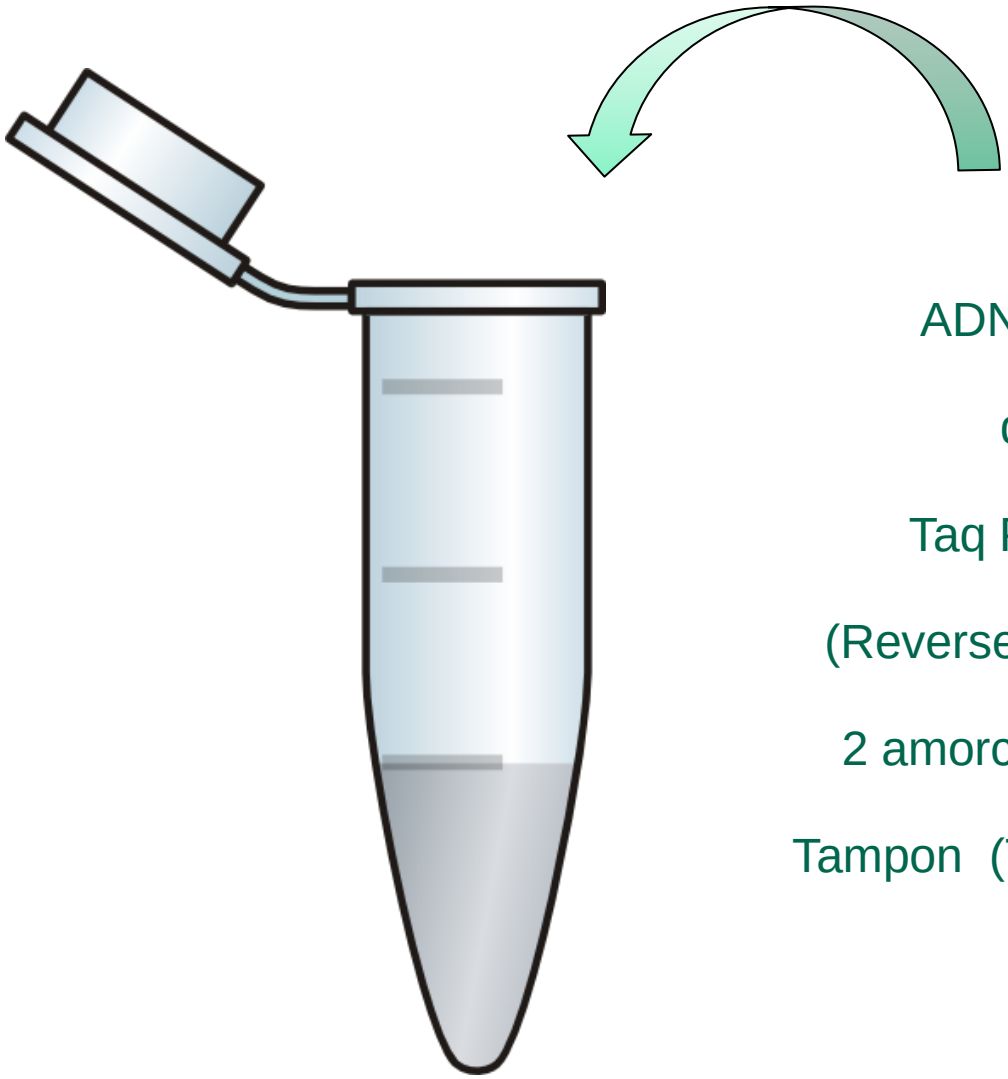
$a.2^n$

a : nombre initial de copies du génome
n : nombre de cycles

Quantité de produit amplifié



Composition du mélange réactionnel (mix)



ADN ou ARN ?

dNTPs

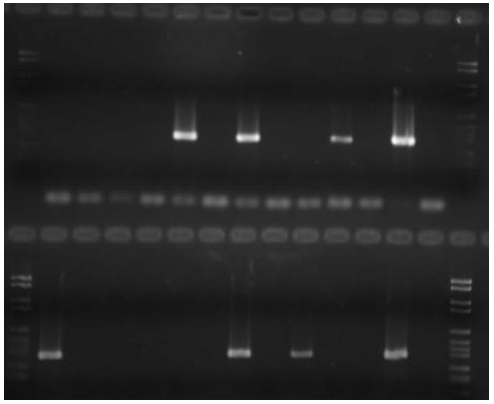
Taq Polymérase

(Reverse Transcriptase)

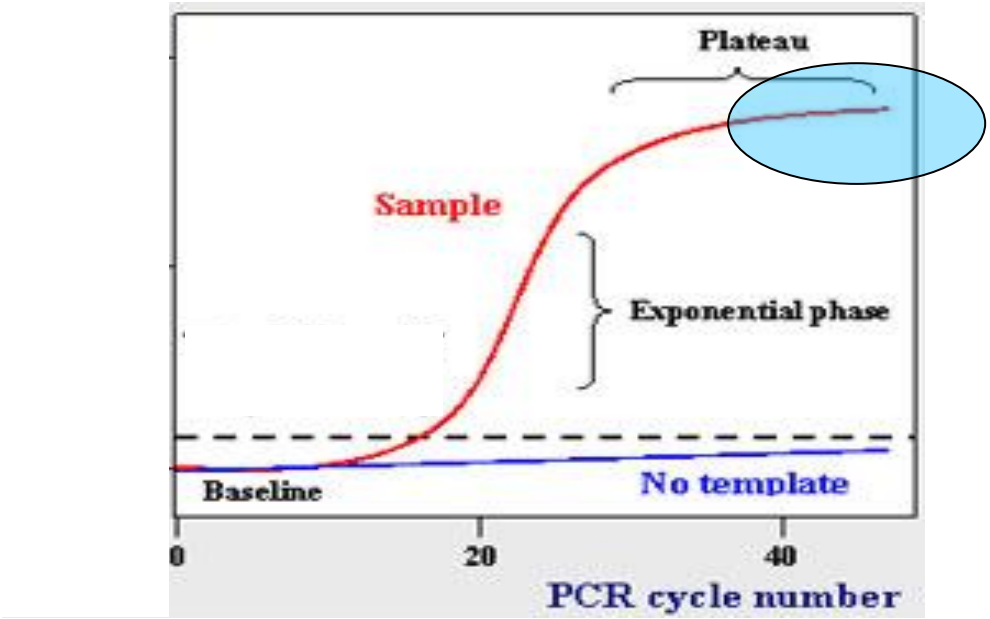
2 amorces spécifiques

Tampon (Tris, KCl, MgCl2)

La PCR conventionnelle



Lecture des résultats (en point final)

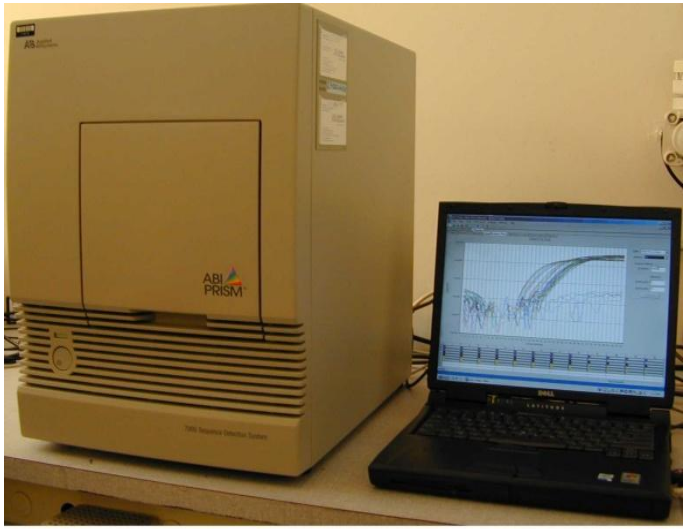


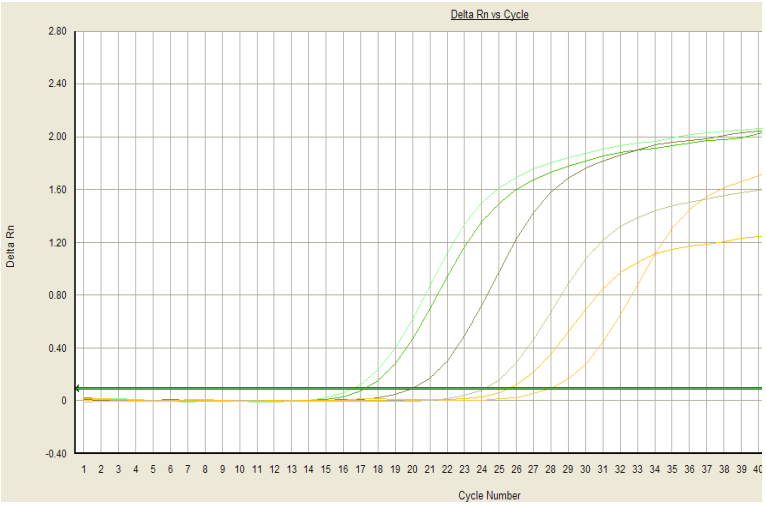
PRECAUTIONS PROPRES A LA MANIPULATION PCR

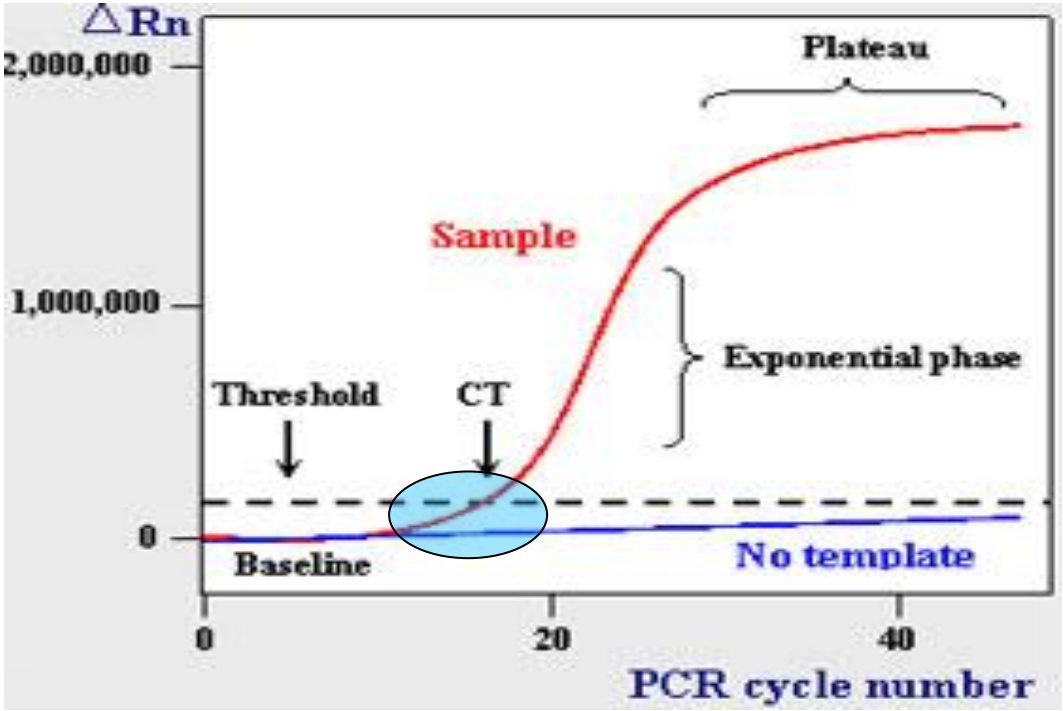
	Préparation des solutions et du mélange réactionnel	Extraction des acides nucléiques	Amplification	Visualisation
Sensibilité aux contaminations	+ + +	+ + +	–	+
Contamination de l'environnement	–	+	–	+ + +
	1 PIECE Séparation par une hotte à flux laminaire		1 PIECE	

Utilisation de gants – Pointes à filtres – Matériel dédié à chaque pièce et poste de travail

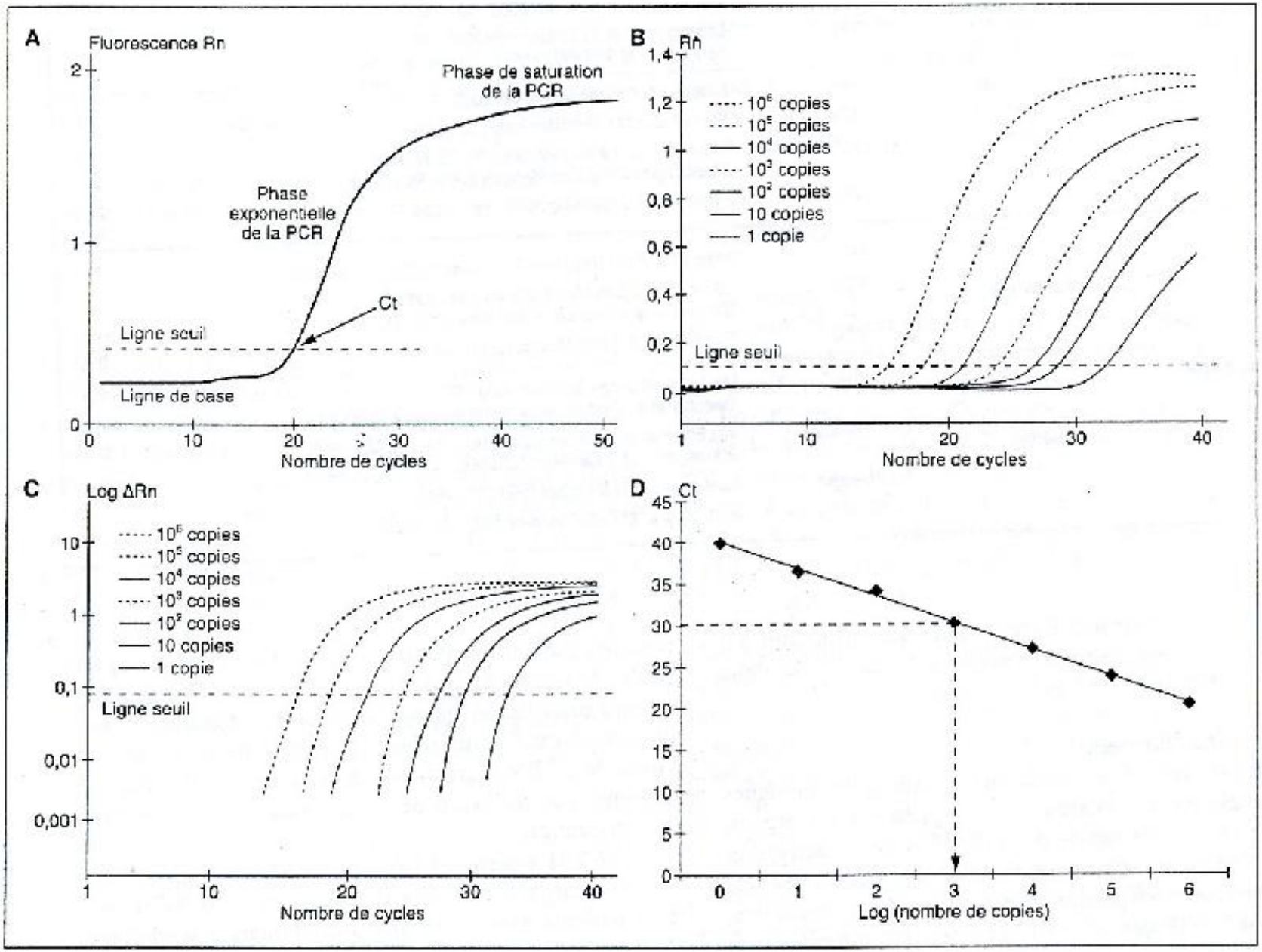
La PCR en temps réel ou PCR quantitative







La PCR en temps réel- Principe



Dilution 1/2

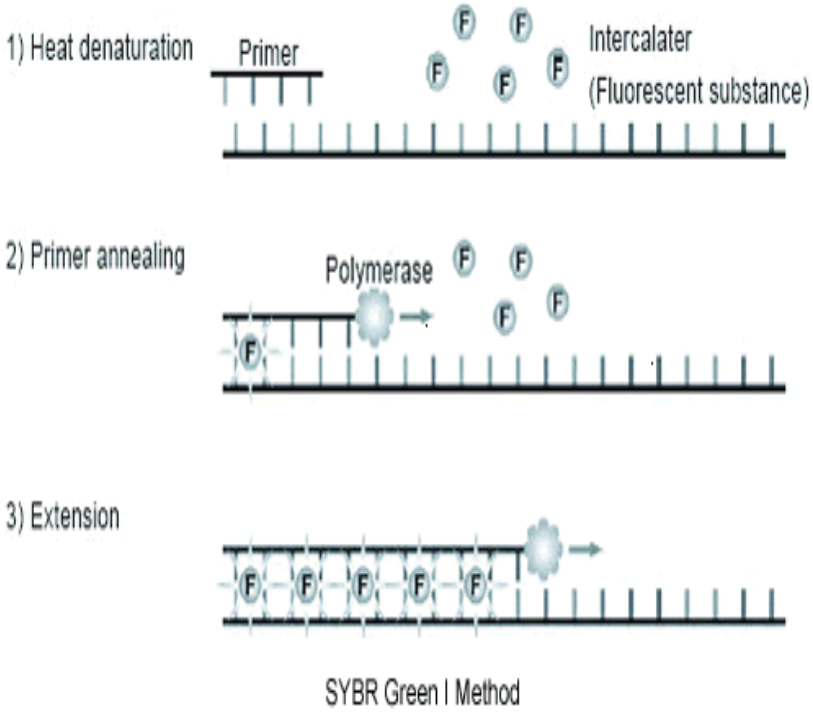
△ CT : 1

Dilution 1/10

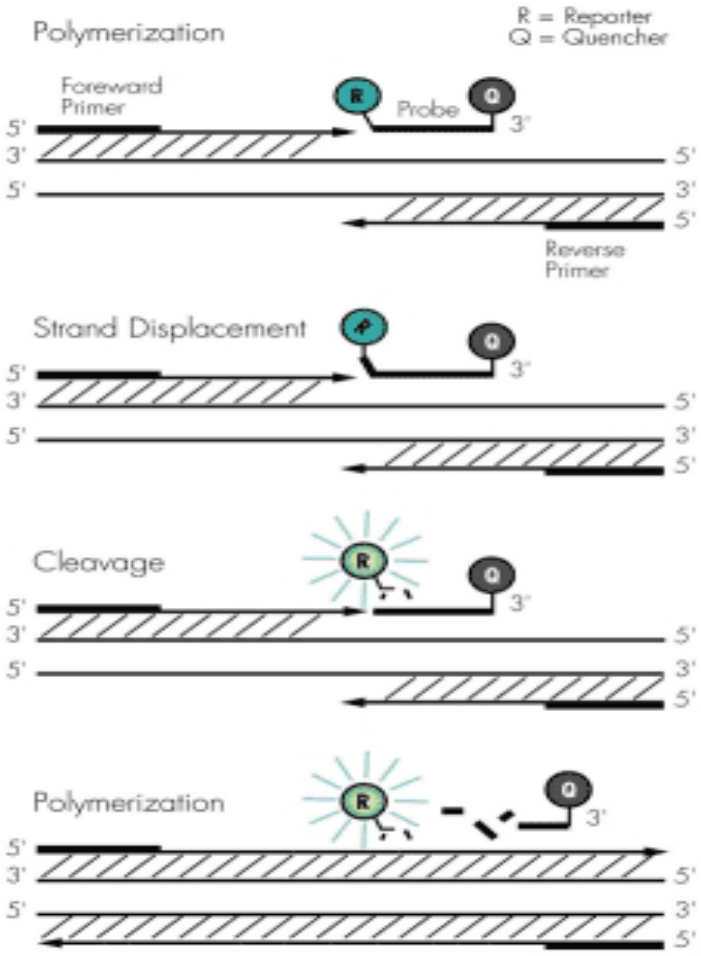
△ CT : 3.32

La PCR en temps réel- La chimie

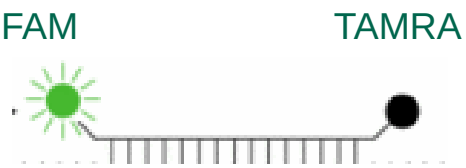
Le système SYBR GREEN



Le système Taqman

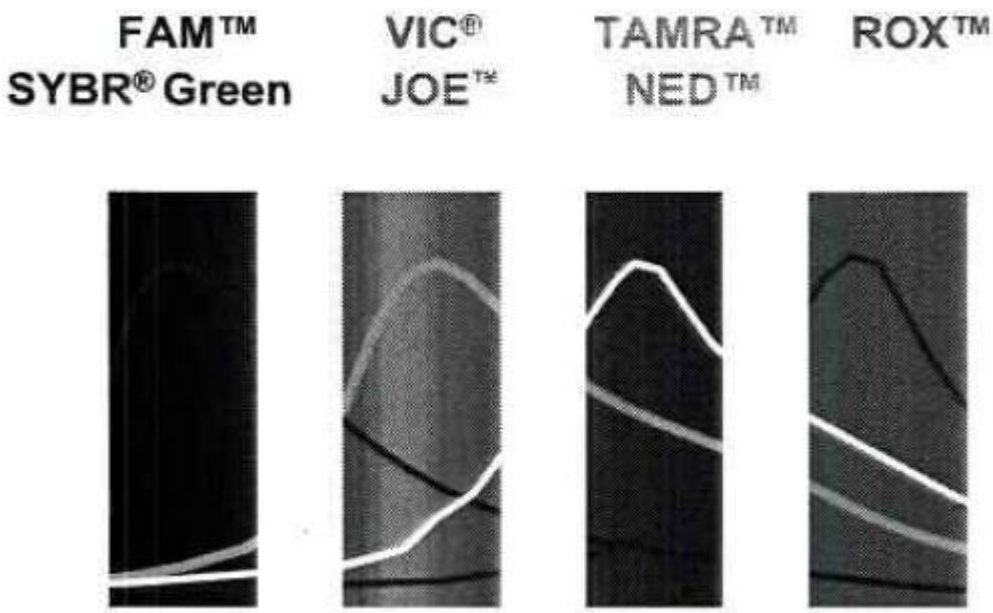


Fluorophores utilisés



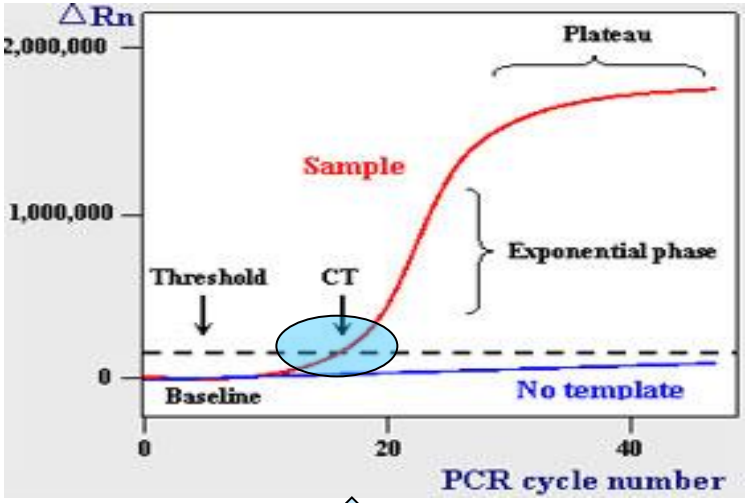
Multicolor Detection

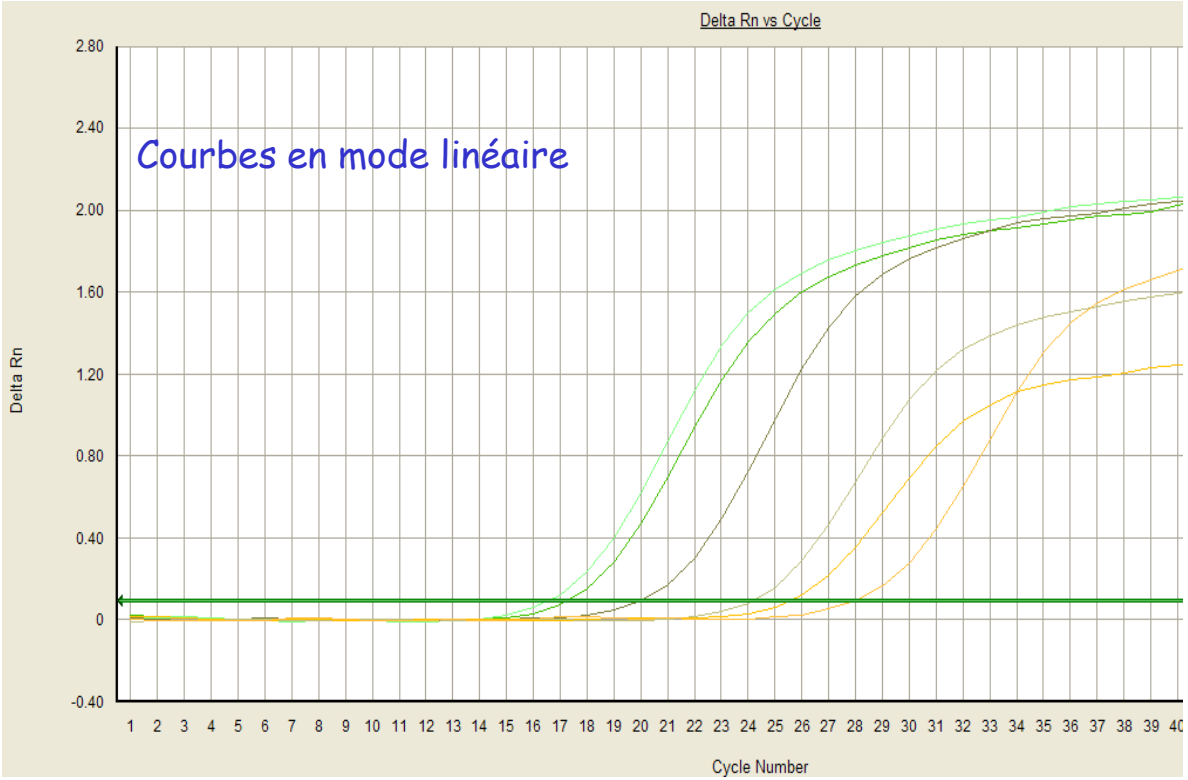
Filters	**7000** SequenceDetection System **7300** Real-Time PCR System	**7500** Real-Time PCR System
A	SYBR® Green I, FAM™ dyes	SYBR® Green I, FAM™ dyes
B	VIC®, JOE™ dyes	VIC®, JOE™ dyes
C	NED™, TAMRA™ dyes	NED™, TAMRA™, CY3™ dyes
D	ROX™ dye	ROX™, Texas Red® dyes
E	-	CY5™ dye

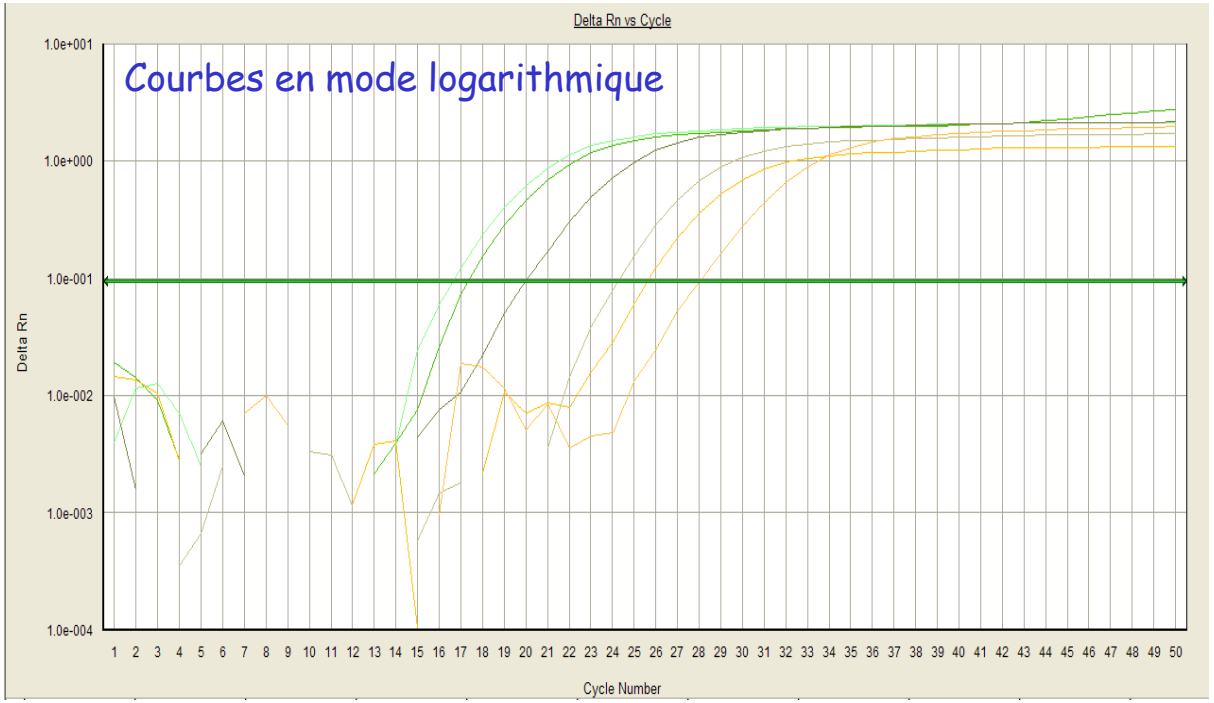


Spectres d'émission

Lecture des résultats

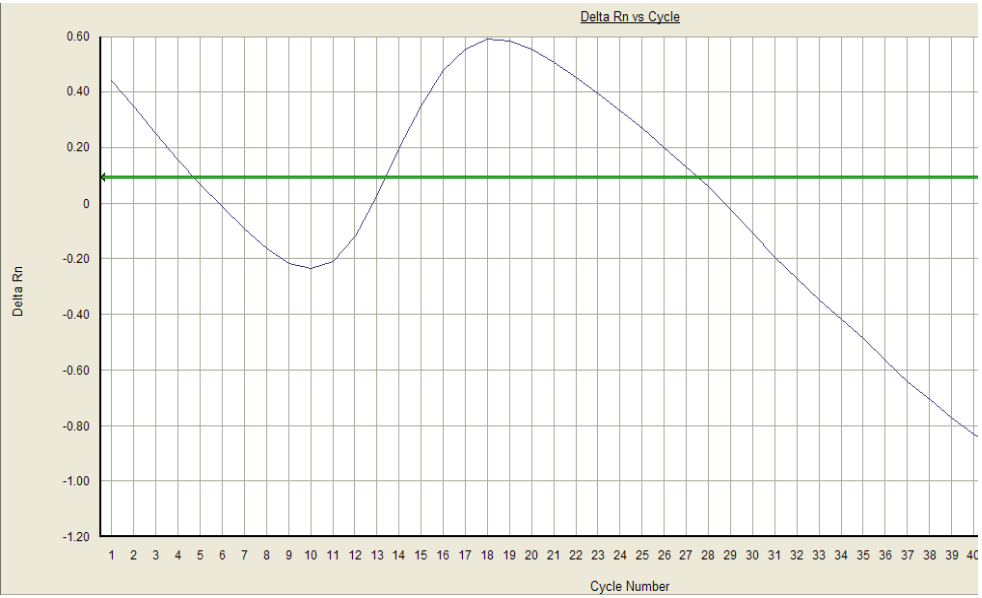


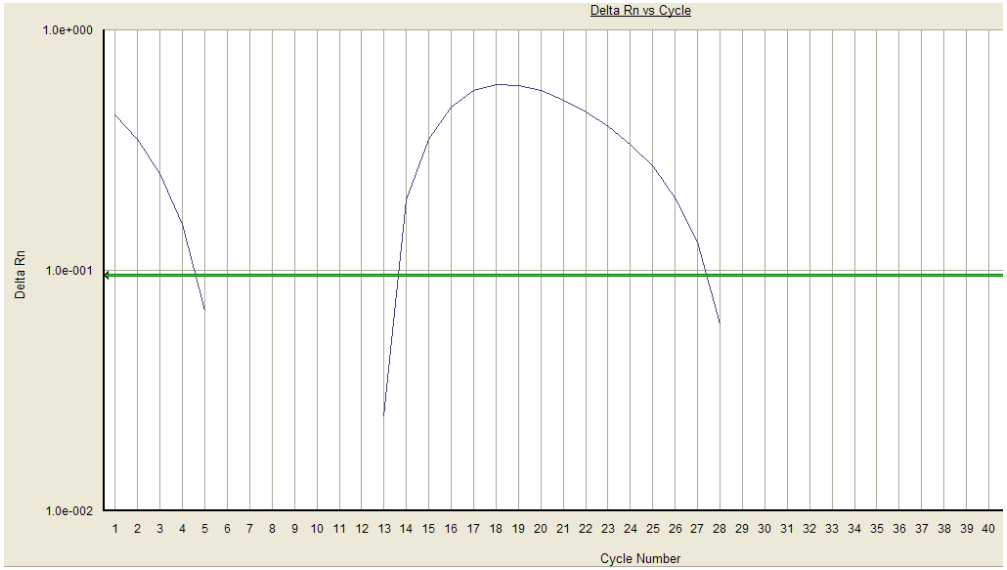




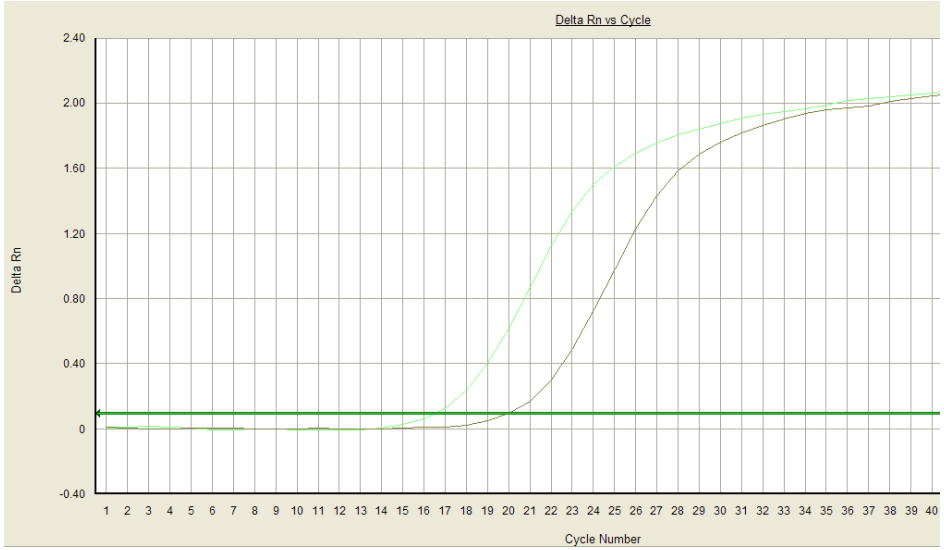
Lecture des résultats
(phase exponentielle)

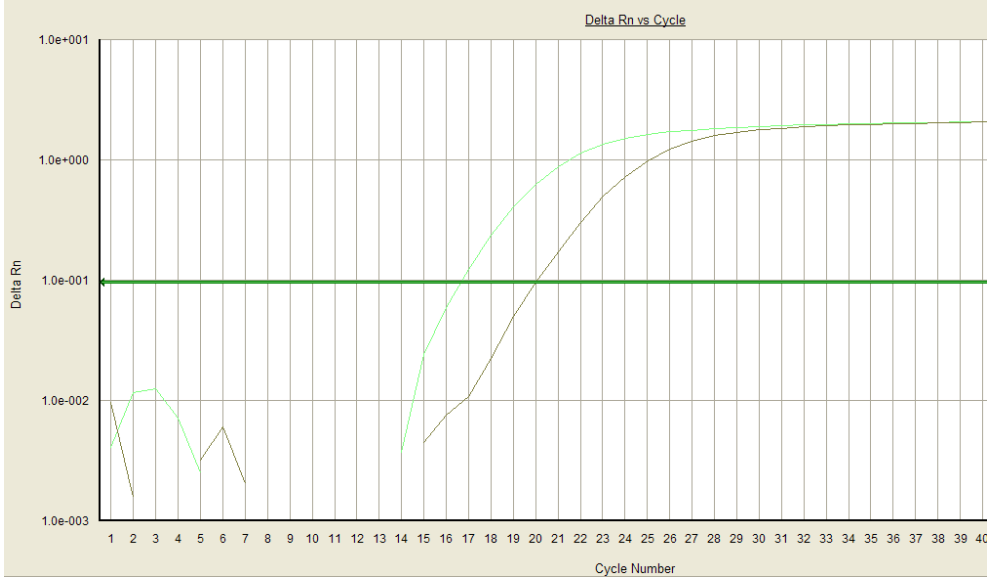
COURBES ATYPIQUES exemple : ARN trop concentré



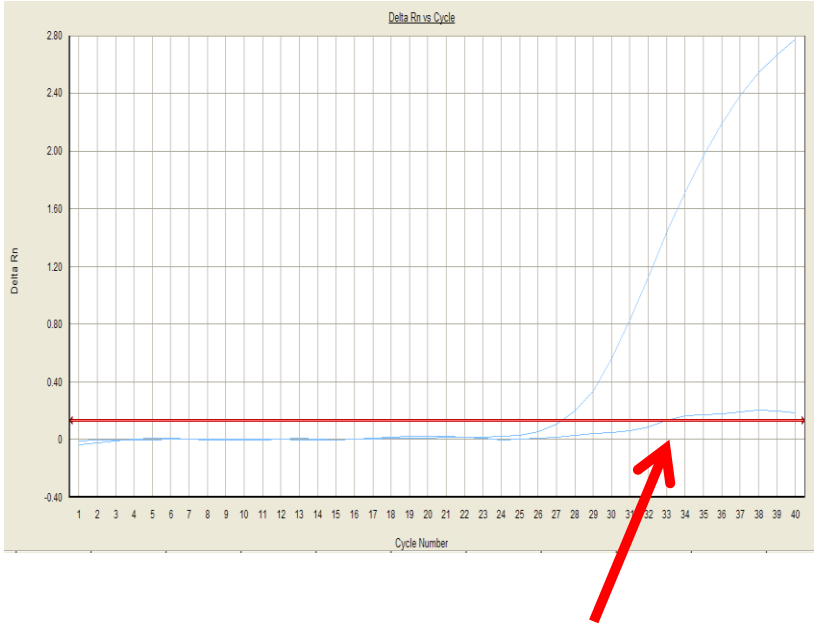


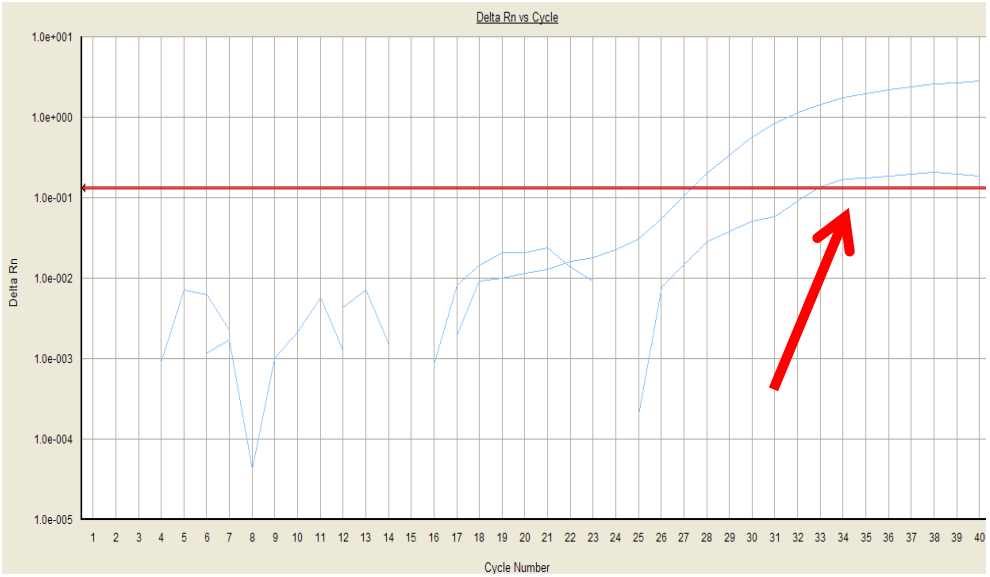
Solution : dilution des ARN (1/10 et 1/100)





COURBES ATYPIQUES : résultats faussement positifs





Setup | Instrument | Results

Plate | Spectra | Component | Amplification Plot | Standard Curve | Dissociation | Report

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct
H10	262	sondeMGB	Unknown	37.58
H10	262	sonde VIC	Unknown	28.02

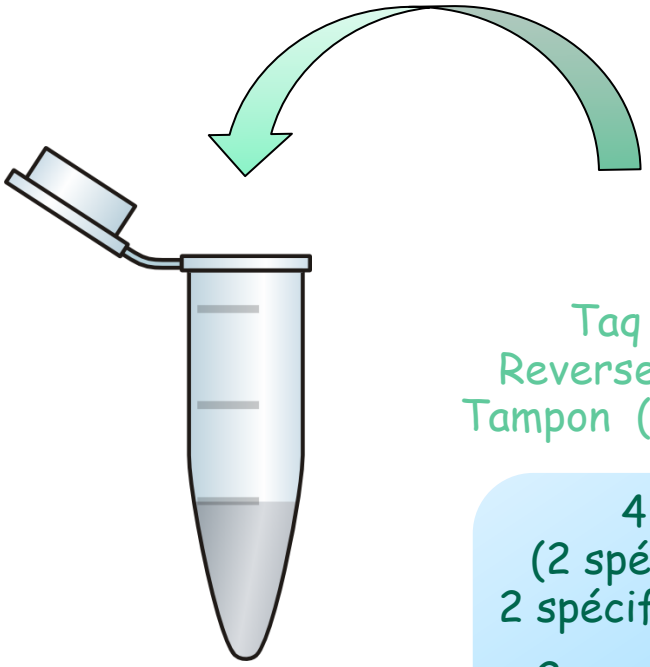
PCR en temps réel multiplex

Amplification **dans un même tube** de plusieurs cibles

Exemple : Cible 1 Segment 10 BTV (sonde FAM) → Pathogène recherché

Cible 2 gène de la β actine (sonde VIC) → Gène présent dans les cellules animales

Internal Positive Control
IPC



ARN

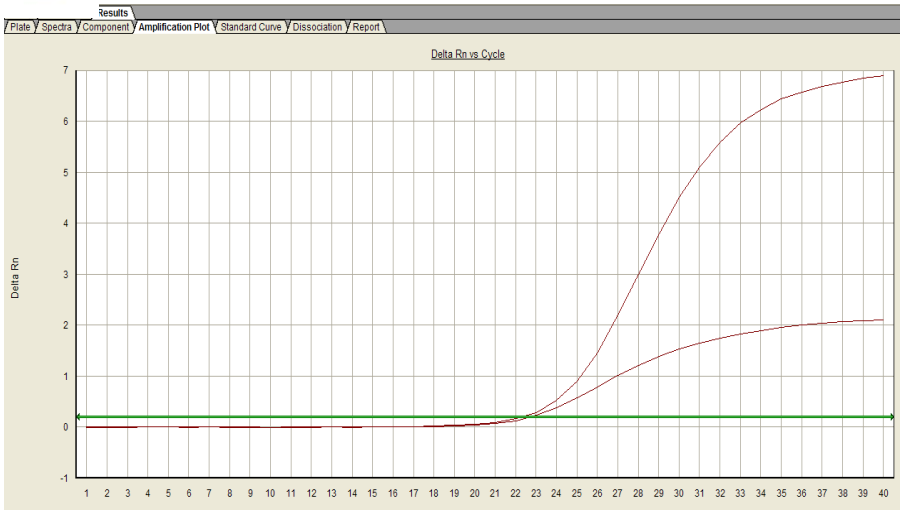
dNTPs

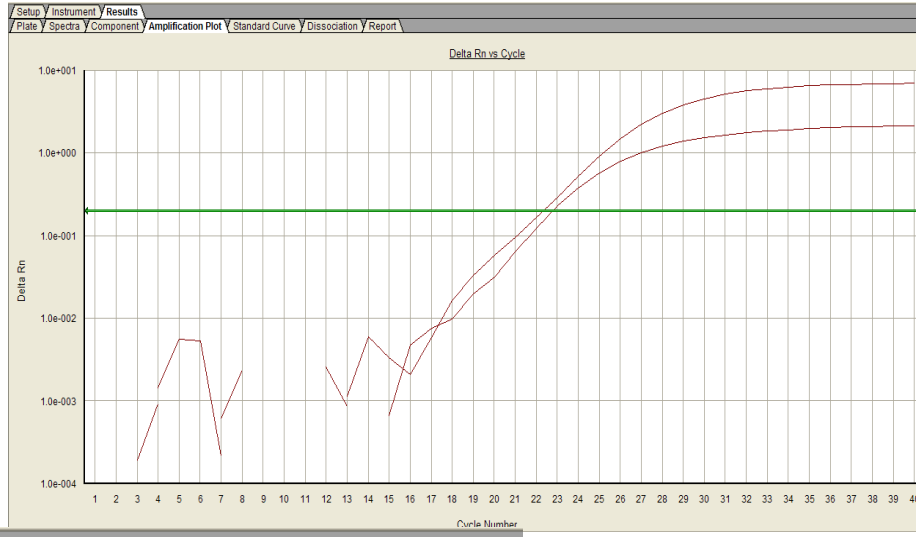
Taq Polymérase
Reverse Transcriptase
Tampon (Tris, KCl, MgCl2)

4 amorces
(2 spécifiques BTV,
2 spécifiques β actine)

2 sondes marquées
(FAM-TAMRA -BTV)
(VIC-TAMRA- β actine)

Echantillon Positif



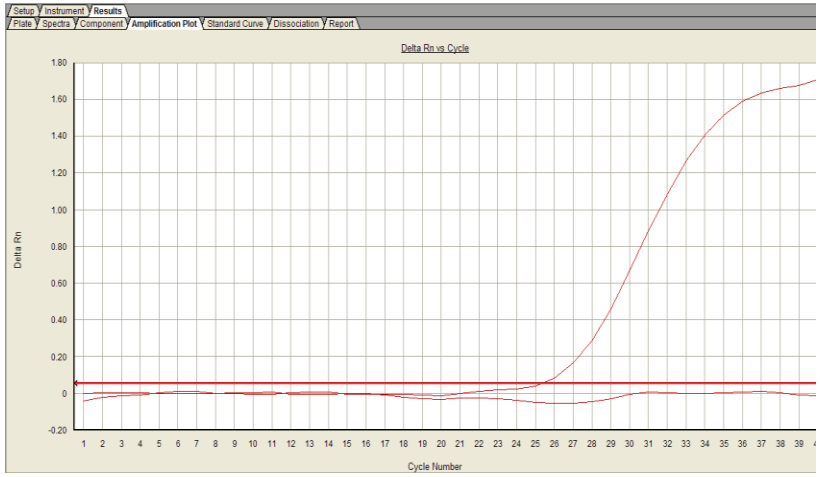


Setup | Instrument | Results

Plate | Spectra | Component | Amplification Plot | Standard Curve | Dissociation | Report

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct
A4	11-9	sondeMGB	Unknown	22.29
A4	11-9	sonde VIC	Unknown	22.74

Echantillon négatif



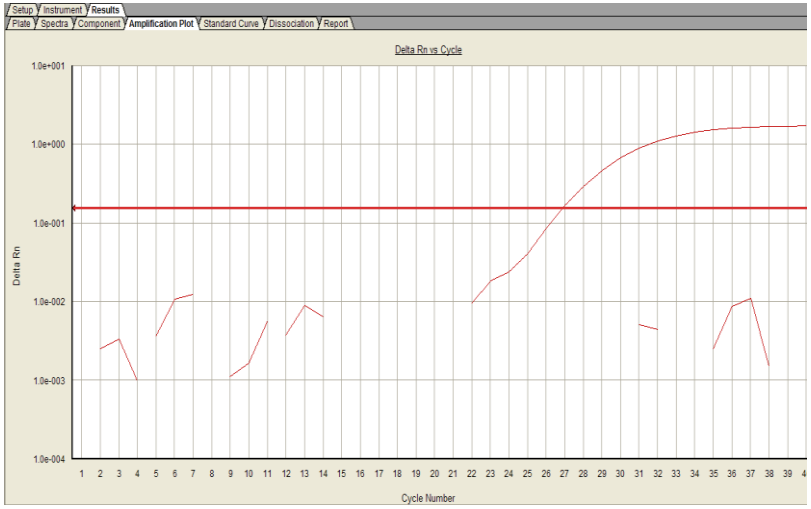


Plate | Spectra | Component | Amplification Plot | Standard Curve | Dissociation | Report

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct
F1	11-6	sondeMGB	Unknown	Undet.
F1	11-6	sonde VIC	Unknown	26.97

Avantages

- Rapidité
- Outil très puissant (sensibilité ++++)
- Spécificité élevée
- Détection du génome (conditions de conservation du prélèvement moins importantes)

Inconvénients

- Sensibilité → Contamination (faux positifs)
- Détection du génome → Interprétation pas toujours évidente
  Lien entre la présence du génome et la clinique !
- Coût

Application au diagnostic de la fièvre Aphteuse

Kamila Gorna

Atelier de formation sur le diagnostic de la FA

21-25 mai 2012

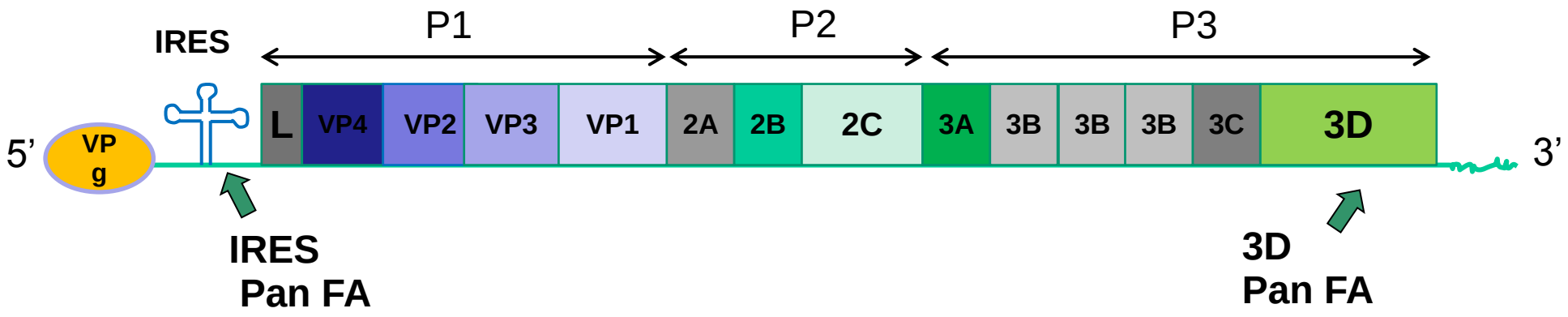
Méthodes RT-PCR en temps réel utilisées au laboratoire

- RT-PCR en temps réel **en deux étapes simplex** pour détection Pan FA (détecte une cible dans une réaction)

Les cibles : IRES et/ou 3D, et cible endogène : β-actine

Sondes TaqMan® marquées FAM (en 5') et TAMRA (en 3')

Analyse d'un échantillon nécessite 3 réactions RT-PCR différentes



Méthodes RT-PCR en temps réel utilisées au laboratoire

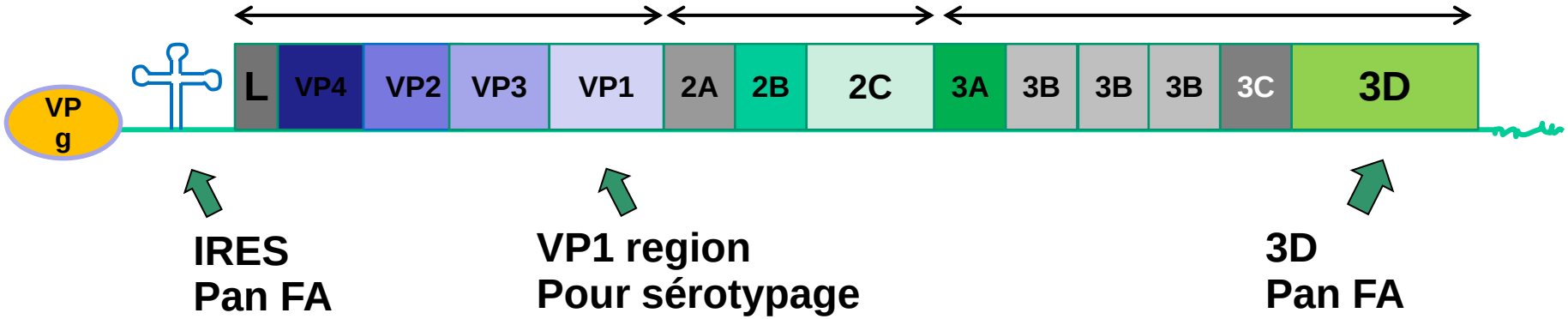
- RT-PCR en temps réel en **une étape duplex** pour détection Pan FA
  (détecte deux cibles dans une réaction)
  Les cibles : IRES et β-actine / 3D et β-actine

- RT-PCR en temps réel en **une étape duplex** pour sérotypage
  (détecte deux cibles dans une réaction)
  Les cibles: O type- β-actine /A type - β-actine /Asia1 type - β-actine /SAT2 type- β-actine*

Sondes TaqMan® marquées **FAM (en 5')** et TAMRA (en 3') pour les **cibles de la FA**

Sondes TaqMan® marquées **VIC (en 5')** et TAMRA (en 3') pour le **cible β-actine**

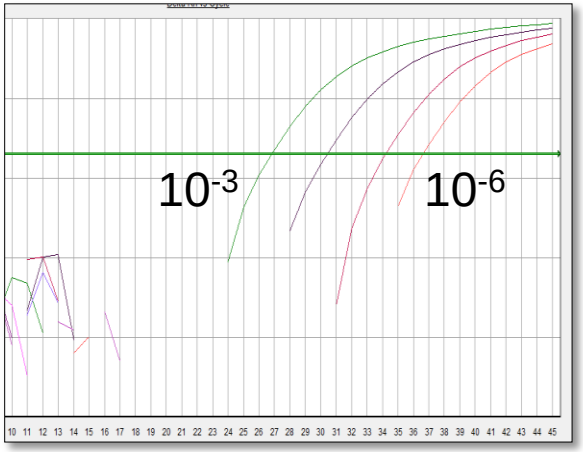
Analyse d'un échantillon nécessite 2 réactions (pour Pan FA)
Suivant le contexte épidémiologique 1 à 4 réactions (pour sérotypage)



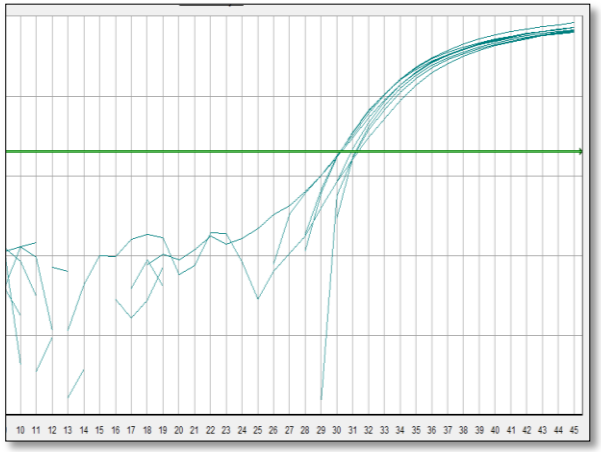
RT-PCR en temps réel en deux étapes simplex pour détection Pan FA

Gamme de dilution du virus FA type O (O Manisa)
(dilutions de 10 en 10 dans le broyat de la langue de bœuf)

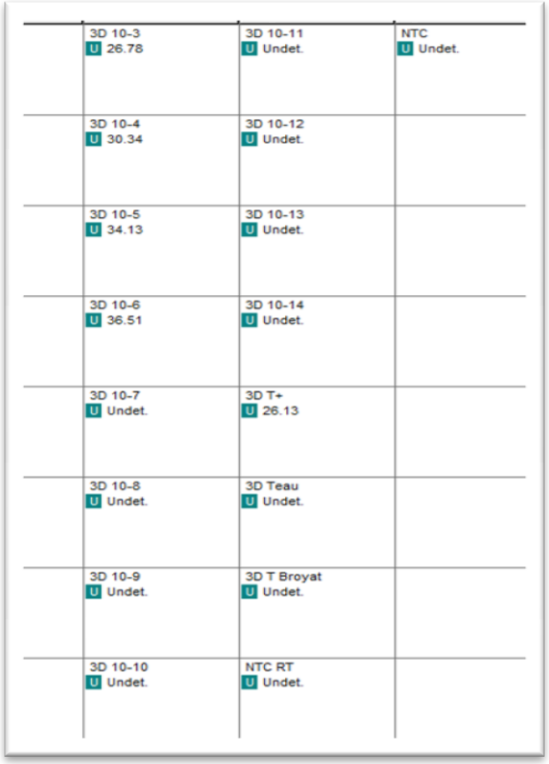
A)



C)

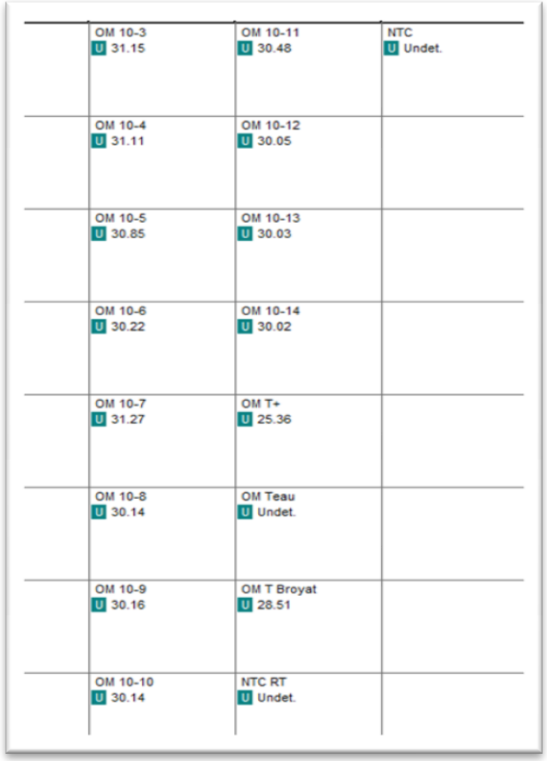


B)



3D 10-3 U 26.78	3D 10-11 U Undet.	NTC U Undet.
3D 10-4 U 30.34	3D 10-12 U Undet.	
3D 10-5 U 34.13	3D 10-13 U Undet.	
3D 10-6 U 36.51	3D 10-14 U Undet.	
3D 10-7 U Undet.	3D T+ U 26.13	
3D 10-8 U Undet.	3D Teau U Undet.	
3D 10-9 U Undet.	3D T Broyat U Undet.	
3D 10-10 U Undet.	NTC RT U Undet.	

D)



OM 10-3 U 31.15	OM 10-11 U 30.48	NTC U Undet.
OM 10-4 U 31.11	OM 10-12 U 30.05	
OM 10-5 U 30.85	OM 10-13 U 30.03	
OM 10-6 U 30.22	OM 10-14 U 30.02	
OM 10-7 U 31.27	OM T+ U 25.36	
OM 10-8 U 30.14	OM Teau U Undet.	
OM 10-9 U 30.16	OM T Broyat U 28.51	
OM 10-10 U 30.14	NTC RT U Undet.	

A) Courbes de RT-PCR pour le cible 3D

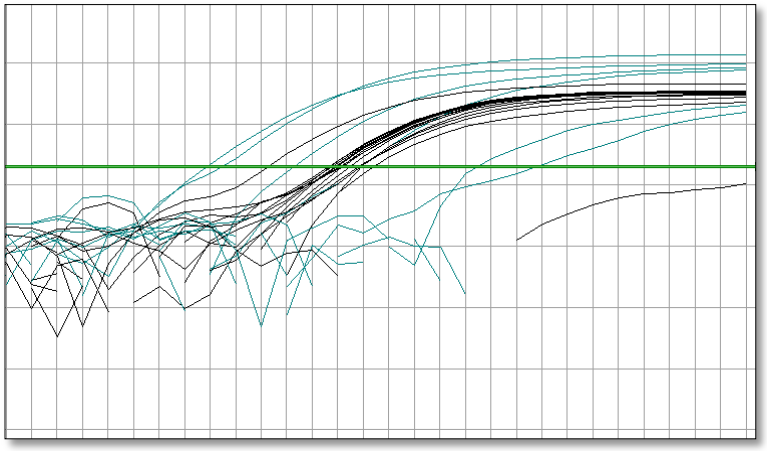
B) Plan de plaque/résultats avec des valeurs CT pour la cible 3D de la FA

C) Courbes de RT-PCR pour les cible β-Actine

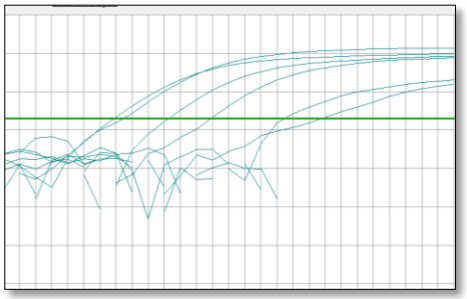
D) Plan de plaque/résultats avec des valeurs CT pour la cible β-Actine

RT-PCR en temps réel en une étape duplex pour génotypage

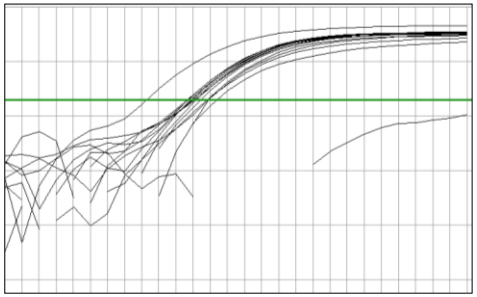
Gamme de dilution du virus FA type O (O Manisa)
(dilutions de 10 en 10 dans le broyat de la langue de bœuf)



Courbes pour les cibles:
FA/3D avec la sonde FAM (Verts)
β-actine avec la sonde VIC (Noirs)



Courbes pour FA la cible 3D



Courbes pour la cible β-actine

	4	5
	OM 10-3 U 23.82 U 30.32	OM 10-11 U Undet. U 28.60
	OM 10-4 U 27.19 U 29.77	OM 10-12 U Undet. U 29.13
	OM 10-5 U 29.82 U 29.37	OM 10-13 U Undet. U 29.06
	OM 10-6 U 34.39 U 29.85	OM 10-14 U Undet. U 28.85
	OM 10-7 U Undet. U 29.83	OM T+ U 24.37 U 26.22
	OM 10-8 U 36.73 U 29.02	OM Teau U Undet. U Undet.
	OM 10-9 U Undet. U 28.57	OM Tbroyat U Undet. U 28.66
	OM 10-10 U Undet. U 28.88	NTC U Undet. U Undet.

Plan de plaque/résultats avec les valeurs CT en **vert** pour 3D et en **noir** pour β-actine

RT-PCR classique pour la détection de la Fièvre Aphteuse

Sérotype	Région nom	Séquence (5'- 3')	Taille attendu
Tous*	IRES1 *sens*	CCT GGT CTT TCC AGG TCT AGA	375 bp
Tous*	IRES4 *reverse*	CCT ATT CAG GCG TAG AAG CTT	
Tous*	3D *sens*	TTC GAG AAC GGC ACG GTC GGA	957bp
Tous*	3D *reverse*	GTA AAG TGA TCT GTA GCT TGG	
Tous**	IRES sens	CGT CHG CGC ACG AAA CGC	527 bp
Tous**	IRES reverse	RCG ATR AAR CAG TCR GTY R	
Tous**	3D sens	GAC AAA GGT TTT GTT CTT GGT CA	295 bp
Tous**	3D reverse	TCA CCG CAC ACG GCG TTC A	

* Utilisé principalement pour la détection de la FA

** Utilisé aussi pour la recherche de mutations dans la région des cibles IRES et 3D de la rtRT-PCR

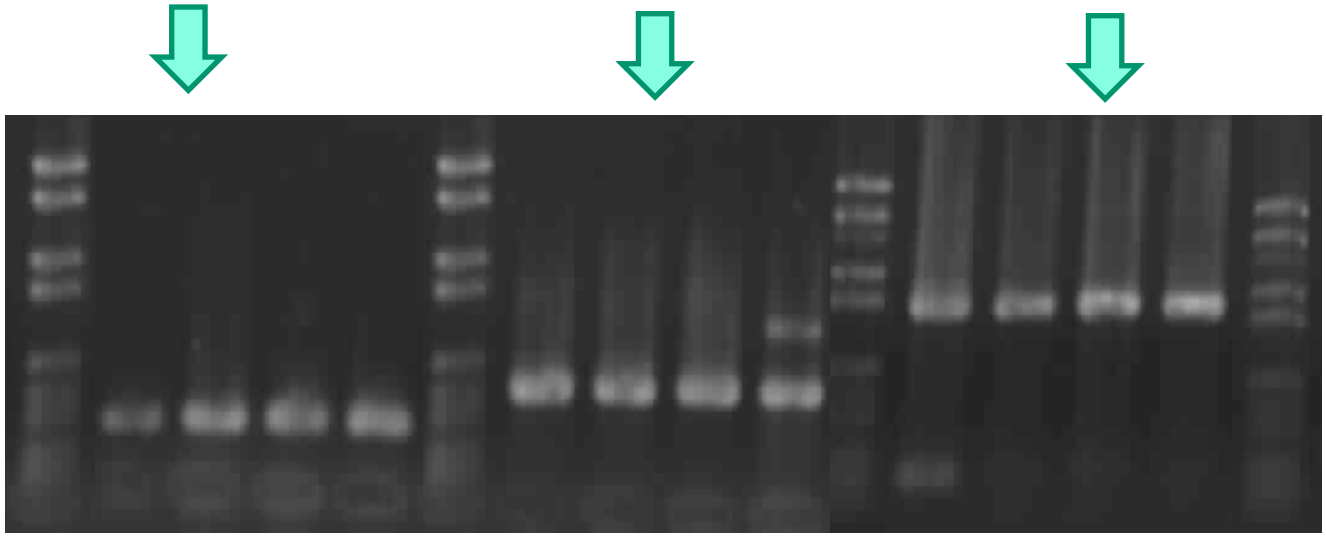
Exemple de résultats

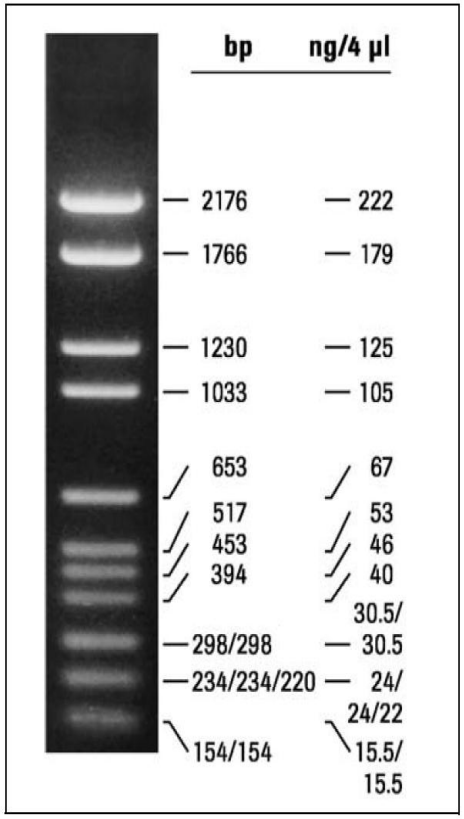
RT-PCR avec les amorces pour amplification des fragments IRES et 3D
(Détection de la FA)

Amorces:
IRES1 (F) IRES4 (R)
Taille attendu: 375bp

Amorces:
IRES (F) IRES (R)
Taille attendu: 527bp

Amorces:
3D (F) 3D (R)
Taille attendu: 957bp





RT-PCR classique pour le sérotypage de la Fièvre Aphteuse

Sérotype	Nom	Séquence (5'- 3')	Taille attendu
Type O	VN-OF sens	AGATTTGTGAAAGTDACACCA	650bp
Type A	VN-AF sens	CTTGCACTCCCTTACACCGCG	416bp
Type Asia1	VN-AsiaF sens	GCGSTHRYYCACACAGGYCCGG	521bp
Tous	VN-VP1R reverse	CATGTCYTCYTGCATCTGGTT	NA
SAT2 (Lybie Egypte)*	SAT2 Fcl SAT2 Rcl	GTAACCCGCTTTGCCATC CGCGTCGAATCTGTCTCTG	288bp

Multiplex RT-PCR

RT-PCR conventionnelle

* Préconisé par IAH Pirbright

Exemple de résultats

RT-PCR avec les amorces pour amplification du fragment VP1 (Sérotypage) pour les échantillons:
de sérotype O, A, Asia1 en RT-PCR multiplex
de sérotype SAT2 en RT-PCR conventionnelle

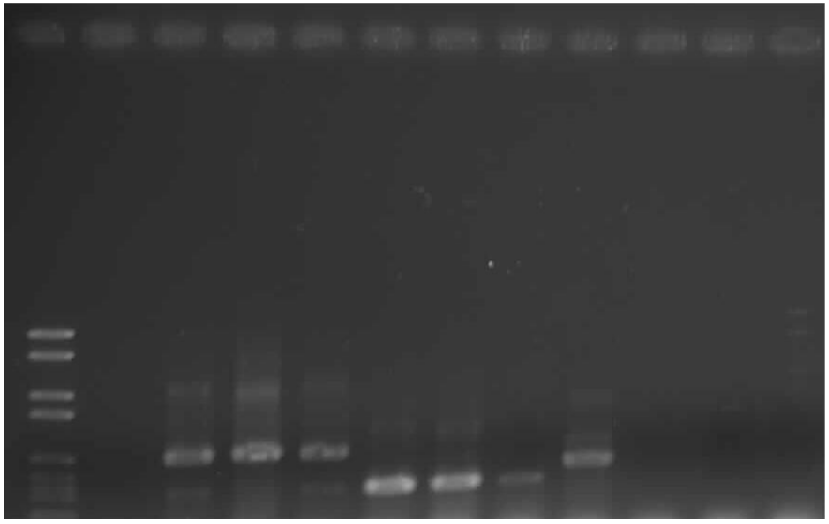
Multiplex RT-PCR

Amorces utilisées:
VN-OF sens
VN-AF sens
VN-AsiaF sens
} VN-VP1R reverse

Taille attendue:
650bp
416bp
521bp

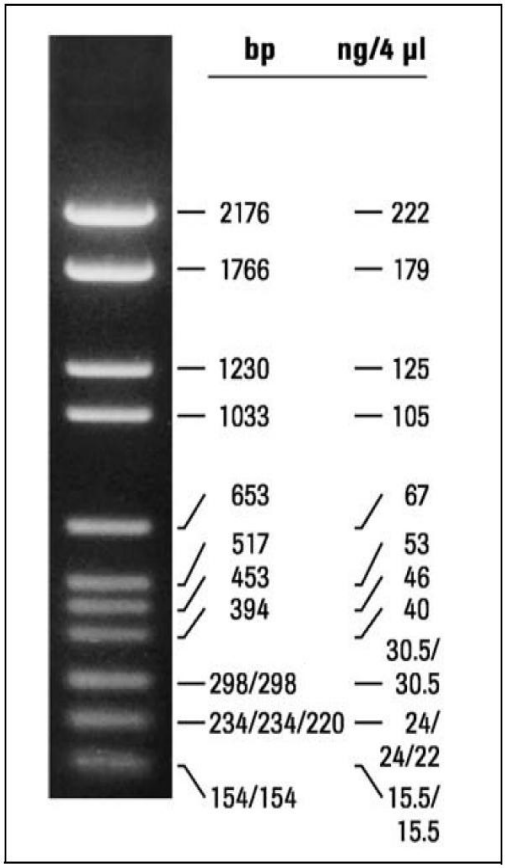
RT-PCR SAT2 conventionnelle

Amorces utilisées:
SAT2 Fcl et SAT2 Rcl
Taille attendue: 288bp



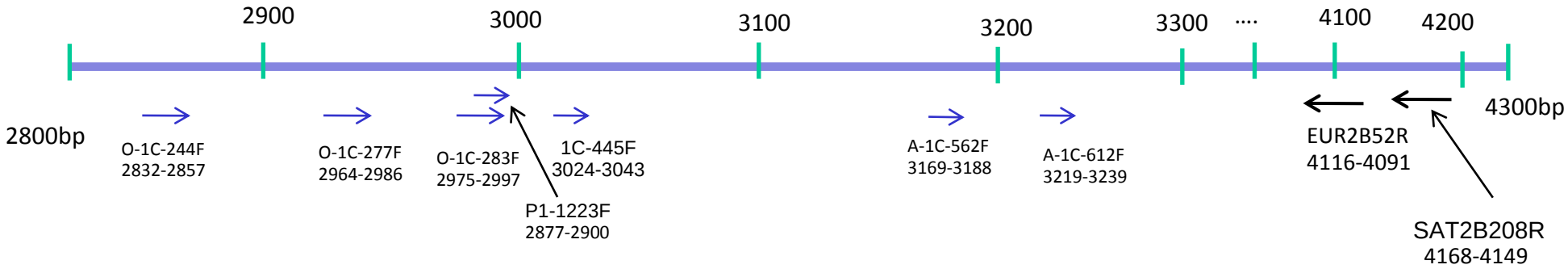
Sérotype O A ASIA SAT1 SAT2

SAT2 Erythrée SAT2 Zimbabwe

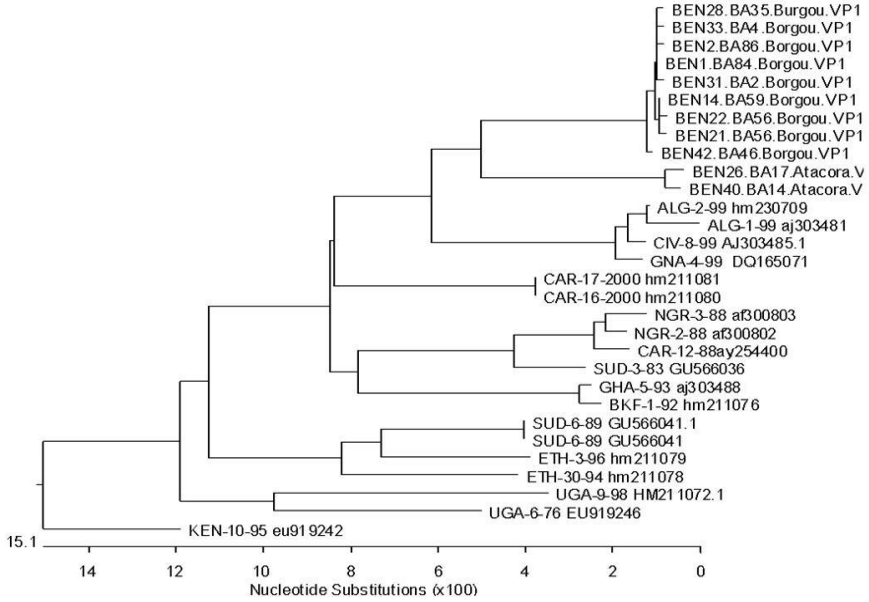


RT-PCR classique ciblant la région VP1 (séquençage)

FA, fragment du génome



Sérotype	Amorce forward	Région (F)	Amorce reverse	Région (R)	Taille de fragment obtenu
O	1C-244F	VP3	EUR-2B52R	2B	1155bp
O	1C-272F	VP3	EUR-2B52R	2B	1130bp
O	1C-283F	VP3	EUR-2B52R	2B	1119bp
A	1C-562F	VP3	EUR-2B52R	2B	846bp
A	1C-612F	VP3	EUR-2B52R	2B	795bp
SAT2	1C-445F	VP3	SAT2B208R	2B	1125bp
SAT2	P1-1223F	VP3	SAT2B208R	2B	1255bp



Etude d'épidémiologie moléculaire

ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC

DE LA FIEVRE APHTEUSE

21-25 mai 2012

ANSES – Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort

Laboratoire National de Référence Fièvre Aphteuse

Agenda

Lundi 21	
9h-9h30	Accueil des participants
9h30 -10	Réunion d'ouverture
10h -12	Présentation : Lutte contre la fièvre aphteuse
12h -14h	**Déjeuner**
14h -15	Présentation : PCR en temps réel
15h -16	Présentation : Biosécurité dans le laboratoire
16h -17h	Présentation : Assurance qualité en diagnostic
Mardi 22	
8h-12	Partie pratique :Préparation des échantillons; test Svanodip; Isolement viral sur cellule
12h -14h	**Déjeuner**
14h -17	Partie pratique :Extraction d'ARN ; RT-PCR classique
Mercredi 23	
8h-12	Partie pratique :RT-PCR en temps réel ; Isolement viral (suite) ; RT-PCR classique (électrophorèse)
12h -14h	**Déjeuner**
14h -17	- Analyse et interprétation des résultats de RT-PCR - Présentation : Typage du FMDV par Ag-ELISA
Jeudi 24	
8h-12	Partie pratique : Ag – ELISA (IAH) ; Isolement viral (suite)
12h-14	**Déjeuner**
14h-17	Partie pratique :Ag – ELISA (IZSLER) ; ELISA NSP
Vendredi 25	
8h-12	Partie pratique :ELISA NSP
12h-14	**Déjeuner**
14h-16	- Réunion de clôture

General information

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious disease, caused by a virus of the genus Aphthovirus of the family Picornaviridae. It affects cloven-hoofed animals, in particular cattle, swine, sheep, goats and deer. FMD is an OIE notifiable disease and is endemic in many regions of the world, including much of Africa, Asia and some countries in South America.It has the potential for causing extensive economic losses to the agricultural sector of a country.

There are seven different serotypes of FMD virus, namely O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 and Asia 1. Infection or vaccination with one serotype, or in some cases even a different sub-type of the same serotype, does not provide immunity against another.

The virus is very easily spread. Animals may become infected by contact with an infected animal, contaminated animal parts or objects. The virus may also spread airborne over substantial distances. The incubation period is usually 2 to 14 days. Symptoms may vary among affected animals. Cattle and pigs develop a sudden fever, followed by an eruption of blisters around the hooves, in the mouth and nose and on udders of females. Sheep and goats may be infected with the disease without showing any symptoms.

Ruminants that recover from FMD can carry the virus for many months, maybe up to years, in their oropharynx. Transmission of clinical disease from carrier to susceptible animal has never been demonstrated, but there is circumstantial evidence that indicates that this would be possible. Therefore the carrier animal must be considered a potential source of virus for future outbreaks.

Early recognition that animals may be suffering from a disease that could be FMD is a critical step in order to take the correct control measures.

This kit is designed to detect Foot and Mouth Disease Virus antigen (FMDV-Ag) in swab and tissue samples, preferably using vesicle fluid and epithelium from acute lesions (unruptured or freshly ruptured), involving mouth, tongue or interdigital/coronary band regions. Non-vesicular body fluids, such as blood, serum, milk and oesophago-pharyngeal liquid collected by probang cup, are not suitable samples for examination in this test.

Principle

The FMDV-Ag test is a simple direct test for the detection of all seven serotypes of the FMDV antigen in swab and tissue samples and can be carried out at penside. FMDV antigen specific antibody has been bound to colloid gold and also immobilised as a thin line on the membrane. If present in the sample, FMDV antigen binds to the gold conjugate and forms an immune complex. The complex then migrates by capillary action along the membrane until it reaches the immobilised antibody in the Test (T) window. The complex will bind to the immobilised antibody, resulting in an accumulation of colloid gold (a red/purple line) visible by eye. A band in the Test (T) window indicates a positive result. No band in the Test (T) window indicates a negative result. The antibody in the Control (C) window will bind the excess colloid gold-antibody (in both positive and negative samples). This C-band assures correct test performance.

Precaution

1. Carefully read and follow all instructions.
2. Store the kit and all reagents at + 4 to +28°C
3. Handle all used materials as though capable of transmitting disease.
4. Do not mix components or instruction booklets from different test kits.
5. Care should be taken to prevent contamination of kit components.

Contents

20 Test devices (in sealed foil bags with desiccant)
1 Sample Buffer bottle (25 mL)
1 Screw cap with dropper
20 Plastic pipettes
20 Test tubes (Eppendorf)
20 Swabs

Specimen collection and processing

A. Unruptured lesions

1. Draw the vesicular fluid with a syringe (not provided) or soak a cotton swab (provided) with vesicular fluid from a manually freshly ruptured lesion.
2. Put the screw cap with dropper on the sample dilution buffer bottle. (For longer periods, the bottle should be stored with the screw cap without dropper.)
3. Add approx. 500 µL (12 drops) of Sample Buffer to test tube.
4. Add approx 500 µL of vesicular fluid from the syringe into the buffer and mix. Alternatively, extract fluids from the cotton buds by inserting the cotton swab into the sample test tube and swirling around in the sample buffer and pressing the cotton bud against the tube wall.
5. If using a swab, this is removed. Close the lid of the test tube with sample solution.

B. Tissue sampling/preparation (ruptured lesions etc)

A separate "Tissue Sample Extraction Kit" is required.

Approximately 0.2 g of epithelium (the size of the nail on the little finger) should be collected from the surface or margins of vesicles or any other tissue of interest. Best results will be achieved with fresh and friable material.

Procedure

Please consult figures on the last page. References to these are indicated with numbers within brackets below.

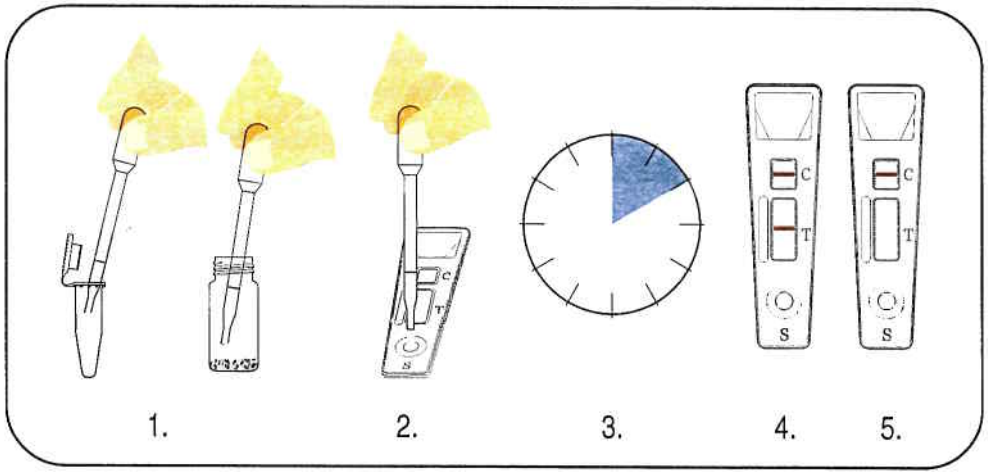
1. Remove the test device from the bag and place on a flat surface.
2. Use the pipette to take prepared sample solution (1). Hold vertically and slowly add 6-8 drops of the sample solution to position "S" on the test device (2).
3. Read results after 10 minutes (3). Always check the results after 30 minutes (thereafter result is unreliable), as it might take longer time for weak positives to form a visual band.

Interpretation of the results

1. A line in the Control (C) window shows that the test has worked correctly. Any device that has not produced a control line at 10 minutes must be classified as void.
2. A line in the Test (T) window indicates a positive result (4) and that the sample contains FMDV antigen. If no line appears in the Test (T) window the test is negative for FMDV antigen (5). If negative, please note that an infection with FMDV should not be competely excluded.
3. A difference in the intensity may occur between the line in the Test (T) and Control (C) window but this does not affect the interpretation of the result.

NOTE!

To confirm either a negative or a positive result, the whole device can be sent to the laboratory for confirmatory testing with PCR.



Developed and validated in collaboration with the

Institute for Animal Health,
Pirbright Laboratory, UK

and

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia, Italy

This manual covers the following FMDV Test kits: Article number 10-4100-13

References

Lab-On-Site: http://www.labonsite.com/workplan.php?id=7

EUFMD: http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/en/eufmd/eufmd.html

FAO: http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/disease_fmd.asp

Manufacturer

Svanova Biotech AB
Uppsala Science Park
SE-751 83 Uppsala, Sweden
Phone +46 18 65 49 00 Fax +46 18 65 49 99
info@svanova.com www.svanova.com

Customer Service
Phone +46 18 65 49 15 Fax +46 18 65 49 99
customer.service@svanova.com

Manual: 19-4100-13/04

Foot and Mouth Disease Virus Antigen Test

SVANODIP® FMDV-Ag

Penside test for the detection of FMDV antigen in swab and tissue samples

Svanova

Svanova

Svanova
Veterinary Diagnostics

Distributed until 2009-10-30
Issued: 2008-11-10

ID # PCI0810

IMPORTANT NOTE !

REGARDING: **1) Content/Format for the SVANODIP® FMDV-Ag Extraction kit**
2) Extraction procedure
(Art # 36-4100-11)

1. Content/Format for the SVANODIP FMDV-Ag Extraction kit

The SVANODIP® FMDV-Ag Extraction kit (art # 36-4100-11) is designed to extract FMDV-Ag from tissues before performing a test with the SVANODIP® FMDV-Ag test kit (art # 10-4100-13). In order to simplify the combined use of both kits, the Sample Buffer and Plastic pipettes have been excluded from the Extraction kit. Enough buffer is included in the SVANODIP® FMDV-Ag test kit (art # 10-4100-13) and the extraction procedure is slightly modified (se point 2 below).

2. Extraction procedure

The extraction procedure has been slightly modified. Previously the Sample Buffer was added into the vial with sand in two steps; one part before and the rest after grinding the tissue.

In the new procedure, the total volume of Sample Buffer is added already in the first step, i.e.before the addition of tissue (please consult step # 1 under "Specimen collection and processing" in the instruction manual). The buffer is added by using the buffer bottle provided in the SVANODIP® FMDV-Ag test kit (art # 10-4100-13).

For any additional information please contact our Customer Service directly.

Svanova Biotech AB, Nov 10 , 2008

Ernst Nilsson
Product Manager

Phone: +46 18 65 49 05
Fax.: +46 18 65 49 99
E-mail: ernst.nilsson@svanova.com
Web-site: www.svanova.com