

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

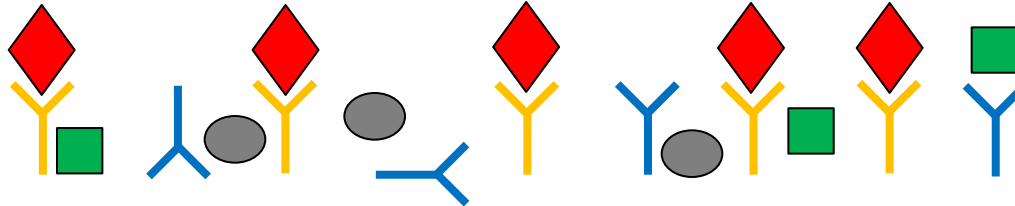
- Les anticorps polyclonaux de Lapin anti-sérotype sont sensibilisés au fond de la plaque.
- Après un lavage, l'étape de capture s'effectue en ajoutant, soit les contrôles positifs, soit l'échantillon à tester.
- Après un second lavage, l'étape de sandwich est réalisée avec les anticorps polyclonaux de cobaye anti-sérotypes.
- Après un troisième lavage, on ajoute un conjugué anti-cobaye marqué à la peroxydase.
- 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

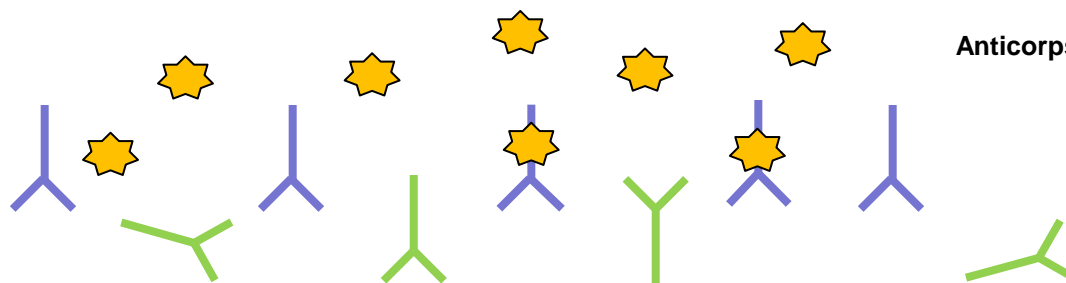
Puits



Schéma explicatif (2)

Anticorps polyclonal de Lapin anti-Cobaye marqué à la peroxydase
Etape de Sandwich

Substrat : OPD
Etape de révélation

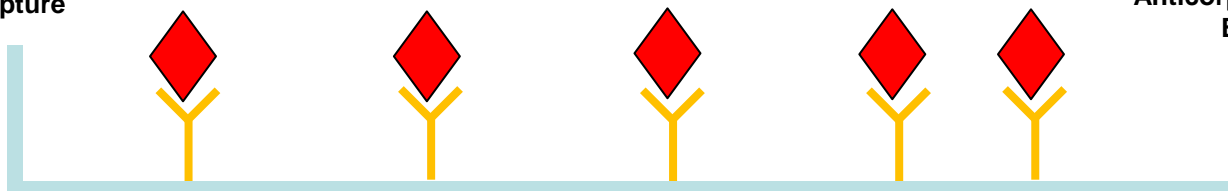


Anticorps polyclonal de Cobaye anti-FA
Etape de Sandwich

Echantillon contenant
des Ag FA Etape de Capture

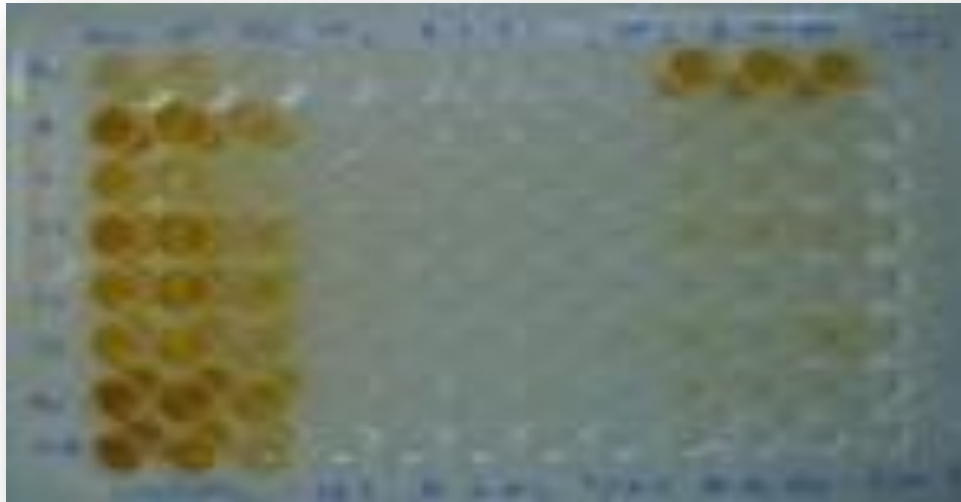
Anticorps polyclonal de Lapin anti-FA
Etape de sensibilisation

Puits



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 1/5^{ème} 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 peroxydase.
- 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

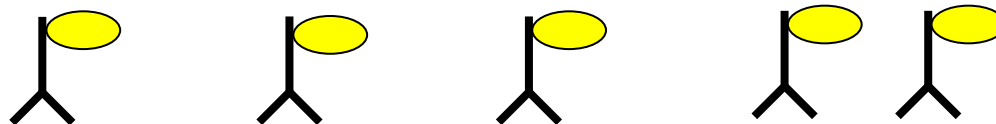
- Ce test est utilisé en première intention lors d'un suivi sérologique dans un cheptel suite à un cas de suspicion ayant entraîné une vaccination d'urgence.
- Ce test permet de détecter la présence d'anticorps dirigés contre les protéines non structurales, qui sont présentes lorsque qu'il y a une infection 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 peroxydase. 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.

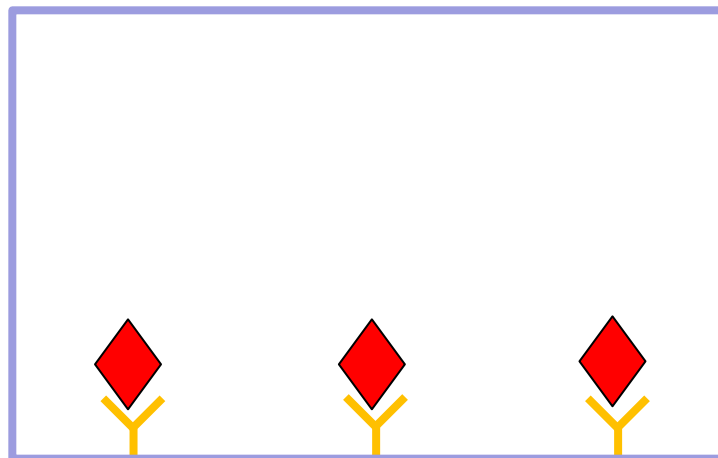
Schéma explicatif

Anticorps Monoclonal anti-3ABC marqué à la peroxydase

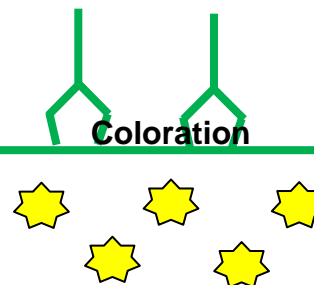


Echantillon d'anticorps

Positif



Coloration



Négatif

Puits
pré-sensibilisé

Anticorps Monoclonal Anti-3ABC
Avec protéine recombinante 3ABC

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 :
 - **$\% inh = 100 - (DO_{\text{contrôles ou échantillon}} / DO_{max}) \times 100$**
- L'échantillon est positif si le % inh est $\geq 50\%$
- L'échantillon est négatif si le % inh est $< 50\%$