

*ATELIER DE FORMATION SUR LE DIAGNOSTIC  
DE LA FIEVRE APHTEUSE  
21-25 mai 2012*

# Compte Rendu

Labib Bakkali-Kassimi  
Sandra Blaise-Boisseau  
Anthony Relmy  
Aurore Romey

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire  
Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort  
23 avenue du Général de Gaulle  
94 706 MAISONS-ALFORT

## **Introduction**

Le Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort de l'ANSES a organisé une formation sur les méthodes de diagnostic de la fièvre aphteuse du 21 au 25 mai 2012. Cette initiative s'inscrit dans le cadre de l'appui que la Commission européenne de lutte contre la fièvre aphteuse (EuFMD) et la FAO fournissent aux pays du nord de l'Afrique pour leur permettre de renforcer leurs capacités de diagnostic des sérotypes viraux identifiés récemment en Egypte et en Libye.

Huit pays ont été sollicités pour envoyer une personne à cette formation. Ces pays sont : Algérie, Liban, Maroc, Mauritanie, Niger, Soudan, Tchad et la Tunisie. Tous les pays ont désigné un candidat pour participer à cette formation. Cependant, pour des raisons administratives, le Maroc et le Soudan n'ont pas pu participer. Un représentant du bureau de la FAO à Tunis a également participé à cette formation. Par ailleurs, une étudiante du Bénin qui effectue un stage au laboratoire dans le cadre de sa thèse a été également invitée par le laboratoire à participer à cette formation (voir Liste des participants).

## **Agenda**

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

## DEROULEMENT DE LA FORMATION

### **Lundi 21**

Les participants ont été accueillis par M. François Moutou (Directeur Adjoint du LSA), Mme Rozenn Saunier (Directrice de la mission des affaires européennes et internationales à l'Anses) et M. Stéphan Zientara (Directeur de l'UMR1161 Virologie). Ils ont souligné l'importance de cette formation et la disposition de l'Anses et du LSA à apporter leur soutien dans la lutte contre la fièvre aphteuse.

Cette journée a été consacrée à des présentations. Une présentation générale sur la fièvre aphteuse et les méthodes de diagnostic a été donnée par Labib Bakkali Kassimi. Elle a été suivie par une présentation sur la méthode PCR appliquée au diagnostic donnée par Corinne Sailleau. La journée a été terminée par une présentation sur la biosécurité au laboratoire donnée par Sébastien Alix.

### **Mardi 22**

Cette journée a débuté par une visite du laboratoire confiné pour la manipulation de la fièvre aphteuse et suivie de la formation pratique.

#### **Préparation des échantillons**

Traitement de 4 échantillons d'épithélium de langue de bovin, nommés échantillons 1 à 4, selon le mode opératoire « préparation des échantillons pour la recherche du virus de la fièvre aphteuse », selon les étapes suivantes réalisées sous PSM II:

- lavage de l'épithélium, dans 2 bains successifs de 5 ml de MEM (Minimum essential medium) additionné de 2% d'antibiotiques (les antibiotiques sont essentiels pour éviter les contaminations bactériennes lors de l'isolement sur culture cellulaire)
- dépôt de l'épithélium dans une boîte de Pétri et découpage en petits fragments pour faciliter l'étape de broyage
- prélèvement de 450 mg d'épithélium et ajout de 4,5ml de MEM (+2% antibiotiques) pour diluer l'échantillon selon le ratio 10% poids/volume
- pour les échantillons 1 et 2, broyage avec le kit Svanova (sable et bâtonnets fournis)



- pour les échantillons 3 et 4, broyage dans un mortier avec un peu de sable stérile à l'aide d'un pilon



*-Option montrée mais non réalisée : broyage à l'aide du ribolyseur (tubes contenant des billes en céramiques provoquant un broyage mécanique par agitation des tubes dans l'appareil)*



- transfert du broyat dans un tube falcon 15ml et centrifugation 10min à 350xg
- récupération du surnageant et contamination artificielle par ajout de trois souches virales distinctes produites au laboratoire et diluées extemporanément respectivement dans 3 des 4 échantillons
- répartition du surnageant en aliquots pour les différents tests à réaliser :
  - 200µl, stockés à 4°C, pour réaliser le test Svanodip dans la matinée
  - 140µl, stockés à 4°C, pour réaliser l'extraction d'ARN dans l'après-midi
  - 300µl, stockés à -80°C jusqu'au lendemain, pour réaliser l'ELISA Ag-IZSLER
  - 1200µl, stockés à -80°C jusqu'au lendemain, pour réaliser l'ELISA Ag-IAH
  - 1200µl, stockés à 4°C, pour réaliser l'isolement viral sur cellules dans la matinée

### Test Svanodip

Réalisation de ce test à partir de 200µl de surnageant de broyat pour chaque échantillon, selon les étapes suivantes :

- dépôt de 200µl de broyat sur le test (cupule S) et migration par capillarité
- lecture du résultat à 10min pour le contrôle interne (C) et l'échantillon (T)
- lecture du résultat à 30min pour le contrôle interne (C) et l'échantillon (T)

N° échantillon	Dilution	Volume	Résultat à 10min		Résultat à 30min	
			Echantillon (T)	Contrôle interne (C)	Echantillon (T)	Contrôle interne (C)
1	Pur	200µl	négatif	OK	négatif	OK
2	Pur	200µl	négatif	OK	douteux*	OK
3	Pur	200µl	négatif	OK	douteux*	OK
4	Pur	200µl	négatif	OK	douteux*	OK

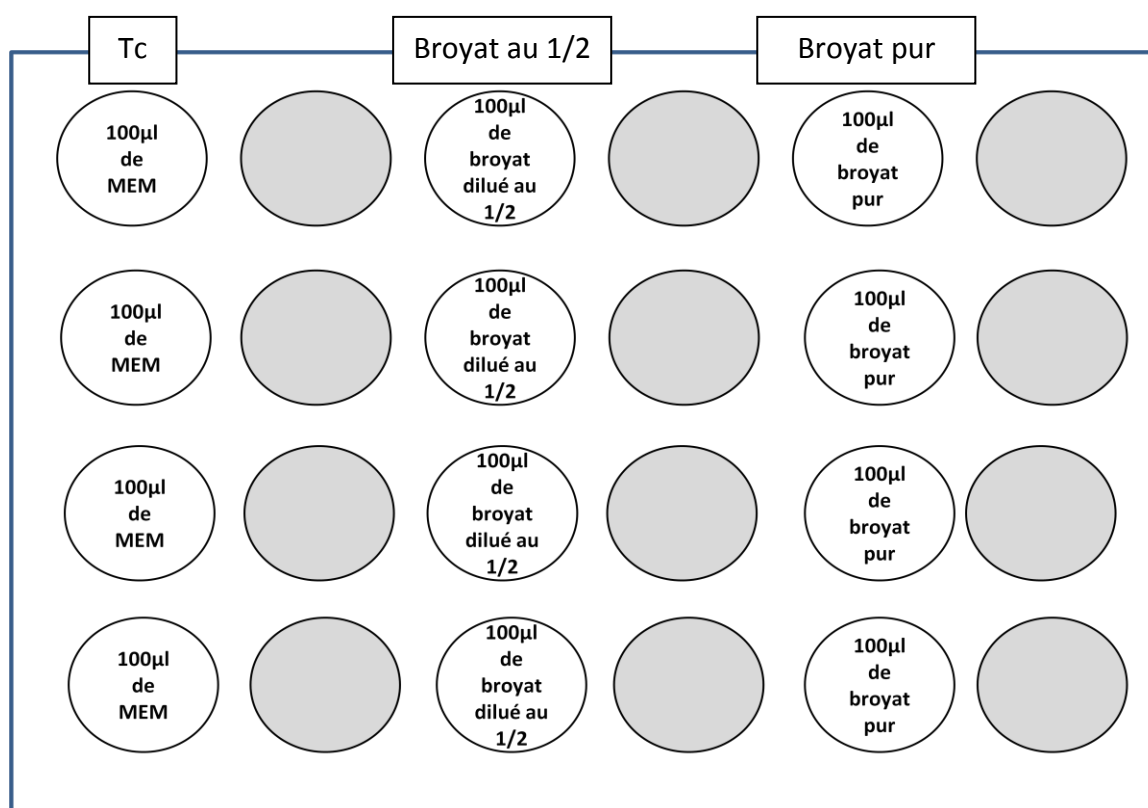


\*pour les échantillons 2, 3 et 4, deux traits très fins sont légèrement visibles

## Isolement viral sur cellules (IBRS-2 et ZZ)

Réalisation de ce test, selon le mode opératoire « recherche du virus de la fièvre aphteuse par isolement viral sur cultures cellulaires », à partir de tapis cellulaires ensemencés précédemment en plaques 24 puits (IBRS-2 le 18/05 et ZZ le 14/05) en traitant 1200µl de surnageant de broyat pour chaque échantillon, selon les étapes suivantes :

- dilution de 400µl de broyat au demi (dans 400µl de MEM+2% antibiotiques)
- élimination, délicatement, du milieu de culture cellulaire
- rinçage de chaque puits avec 500µl de MEM+2% antibiotiques et élimination du milieu de rinçage, délicatement
- ajout de 100µl d'inoculum par puits selon le plan de plaque suivant :



- incubation 1h à 37°C dans le caisson sous CO2
- élimination de l'inoculum délicatement
- ajout délicatement de 500µl de milieu complet par puits :
  - pour les IBRS-2, MEM +2% antibiotiques +2,5% Hepes
  - pour les ZZ, IMDM/DMEM-F12 (50% vol/vol) +2% antibiotiques
- incubation à 37°C dans le caisson sous CO2 et observation régulière des tapis cellulaires : à 4hpi (heures post isolement), 21hpi, 25hpi, 46hpi et 48hpi.

## Isolement viral sur cellules (IBRS-2 et ZZ)

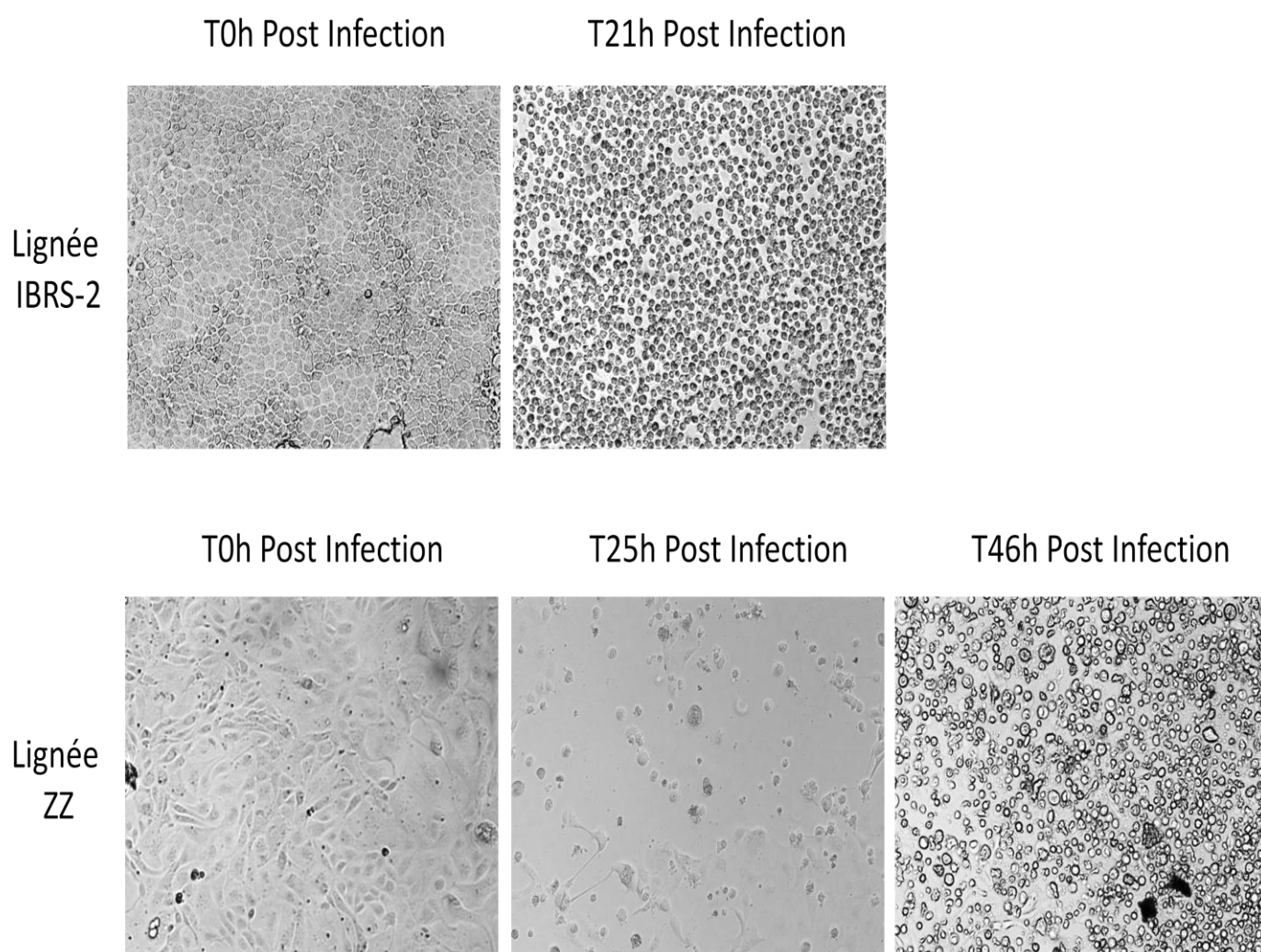
### Résultats

Echantillon	Lignée cellulaire	Inoculum	Présence(+)/Absence(-) d'ECP* par cupule				Observations
			Temps post-isolement (en heures)				
			4h	21h	25h	48h	
1	IBRS-2	Echantillon pur	----	----	----	----	/
		Echantillon au 1/2	----	----	----	----	/
		Tc	----	----	----	----	/
	ZZ	Echantillon pur	----	----	----	----	/
		Echantillon au 1/2	----	----	----	----	/
		Tc	----	----	----	----	/
2	IBRS-2	Echantillon pur	----	++++	/	/	Stockage à -80°C à 21hpi
		Echantillon au 1/2	----	++++	/	/	
		Tc	----	----	/	/	
	ZZ	Echantillon pur	----	----	++++	++++	/
		Echantillon au 1/2	----	----	++++	++++	/
		Tc	----	----	----	----	/
3	IBRS-2	Echantillon pur	----	++++	/	/	Stockage à -80°C à 21hpi
		Echantillon au 1/2	----	++++	/	/	
		Tc	----	----	/	/	
	ZZ	Echantillon pur	----	----	++++	++++	/
		Echantillon au 1/2	----	----	++++	++++	/
		Tc	----	----	----	----	/
4	IBRS-2	Echantillon pur	----	++++	/	/	Stockage à -80°C à 21hpi
		Echantillon au 1/2	----	++++	/	/	
		Tc	----	----	/	/	
	ZZ	Echantillon pur	----	----	++++	++++	/
		Echantillon au 1/2	----	----	++++	++++	/
		Tc	----	----	----	----	/

\*ECP : effet cytopathique

Isolement viral sur cellules (IBRS-2 et ZZ)  
Résultats (suite)

Photos prises au microscope inversé au grossissement x10 :





## Isolement viral sur cellules (IBRS-2 et ZZ)

### Conclusions

Echantillon	Isolement sur IBRS-2	Isolement sur ZZ	Conclusions / Observations
1	Absence d'ECP à 48hpi	Absence d'ECP à 48hpi	Faire un 2 <sup>nd</sup> passage
2	ECP à 21hpi	ECP à 25hpi	Forte suspicion de présence du virus de la FA
3	ECP à 21hpi	ECP à 25hpi	Forte suspicion de présence du virus de la FA
4	ECP à 21hpi	ECP à 25hpi	Forte suspicion de présence du virus de la FA

Pour pouvoir conclure sur le statut de l'échantillon 1 (ne présentant pas d'ECP à 48hpi) il aurait fallu réaliser un second passage sur cellules, en congelant /décongelant les plaques d'isolement viral à -80°C (pendant au moins 1h) pour faire éclater les cellules, puis réaliser de nouveau un isolement viral sur de nouveaux tapis cellulaires. Nous n'avons pas pu réaliser ce second passage au cours de l'atelier par manque de temps.

L'effet cytopathique observé sur les IBRS-2 et les ZZ après isolement des échantillons 2, 3 et 4 permet de dire qu'il y a une forte probabilité de présence du virus de la fièvre aphteuse dans ces 3 échantillons. Cependant, un ECP sur cellules peut être dû à d'autres agents pathogènes, voir une toxicité. La présence du virus FMD dans les cultures infectées doit donc être confirmée par la réalisation d'autres méthodes.

## Extraction d'ARN manuelle sur colonnes Qiagen

Réalisation de ce test, selon le mode opératoire « extraction des ARNs génomiques viraux avec les colonnes QIAamp Viral RNA (Qiagen) », à partir de 140µl de surnageant de broyat pour chaque échantillon, et à partir de 140µl d'eau ultra pure pour le témoin négatif d'extraction (Tneg EXT), selon les étapes suivantes :

- ajout de 560µl de tampon de lyse (buffer AVL additionné de 1% de carrier RNA-AVE extemporanément) par échantillon, vortexer par à-coups pendant 15sec, incubation 10min à température ambiante

- centrifugation des tubes brièvement, ajout de 560µl d'éthanol, vortexer les tubes pendant 15sec par à-coups, puis centrifugation brièvement

- prélèvement de 630µl de lysat et les déposer soigneusement sur une colonne du kit placée sur un tube de collection du kit, centrifuger 1min à 6 000xg. Recommencer cette étape afin de filtrer tout le lysat

- élimination du tube de collection, remettre la colonne sur un nouveau tube de collection, ajout de 500µl du 1<sup>er</sup> tampon de lavage (AW1), centrifuger 1min à 6 000xg

- élimination du tube de collection, remettre la colonne sur un nouveau tube de collection, ajout de 500µl du 2<sup>ème</sup> tampon de lavage (AW2), centrifuger 3min à 20 000xg

- élimination du tube de collection, remettre la colonne sur un nouveau tube de collection, centrifuger 1min à 14 000xg

- placer la colonne dans un microtube de 1,5 ml (non fourni par le kit), mettre 100µl du tampon d'élution (AVE), incubé pendant 1 à 2 min à température ambiante, centrifuger 2min à 6 000xg

- élimination des colonnes, boucher les tubes contenant les ARNs élués.

Stockage des ARN à +4°C dans la glace en attendant de préparer les mix de rt-PCR classique, puis stockage du reste des ARN à -80°C jusqu'au lendemain.

## RT-PCR classique pour détection et génotypage (mardi 22 et mercredi 23/05/2012)

Réalisation de ce test selon le mode opératoire « recherche du virus de la fièvre aphteuse par détection de l'ARN génomique par rt-PCR classique », à partir des ARN extraits, selon les étapes suivantes :

-préparation de 3 mix selon les tableaux ci-dessous, en incluant, pour chaque mix, un NTC (*non template control*) et au moins un contrôle positif (ARN de contrôle):

Réactifs	Détection		Génotypage	
	Mix 3D (cible 3D panFA) ou Mix SAT2 (génotype SAT2 amorces IAH souches Lib et Egy)		Mix mult (multiplex pour génotypage O, A, Asia)	
	Volume pour une réaction (µl)	nombre d'échantillons	Volume pour une réaction (µl)	nombre d'échantillons
		9		11
Eau RNase Pure	12,6	113,4	12,2	134,2
Tampon 5X One-Step RT-PCR	5,0	45,0	5,0	55,0
dNTPs (mix)	1,0	9,0	1,0	11,0
Amorce Forward (100µM)	0,2	1,8		
Amorce Forward Type O (100µM)			0,2	2,2
Amorce Forward Type A (100µM)			0,2	2,2
Amorce Forward Type Asia1 (100µM)			0,2	2,2
Amorce Reverse (100µM)	0,2	1,8	0,2	2,2
One-Step RT-PCR enzyme Mix	1,0	9,0	1,0	11,0
<b>Total à distribuer par puits (µl)</b>	<b>20,0</b>		<b>20,0</b>	
<b>Volume ARN par puits (µl)</b>	<b>5</b>		<b>5</b>	

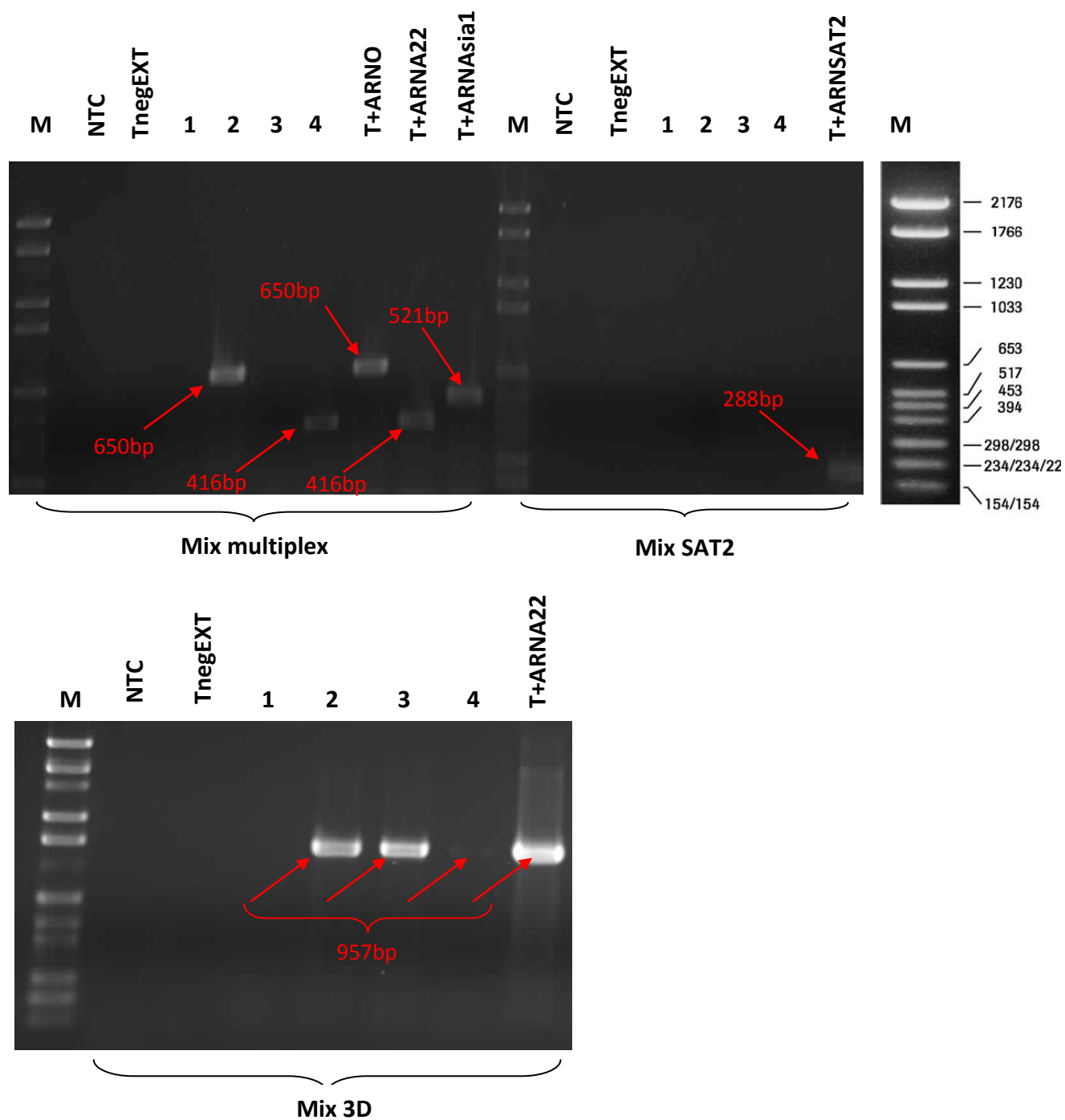
-réalisation de l'assemblage (ajout de 5µl d'ARN par échantillon)  
-lancer les rt-PCR classiques (sur la nuit), selon les cycles temps/température définis dans le mode opératoire

### **Mercredi 23**

- préparation du gel d'agarose à 1% en TAE 1X pour l'analyse des résultats de la RT-PCR
- chargement des ADN amplifiés sur la nuit et migration à 120 volts pendant 1h
- coloration du gel dans un bain de BET pendant 10min et photographie sous UV

## RT-PCR classique pour détection et génotypage

### Résultats



## RT-PCR classique pour détection et génotypage

### Conclusions

Echantillon	Détection 3D panFA	Détection SAT2 Lib/Egy	Typage			Conclusions / Observations
			O	A	Asia1	
1	Non	Non	Non	Non	Non	Génome du virus de la FA non détecté
2	Oui	Non	Oui	Non	Non	Détection du génome de la FA et caractérisation du type O
3	Oui	Non	Non	Non	Non	Détection du génome de la FA sans caractérisation du type
4	Oui	Non	Non	Oui	Non	Détection du génome de la FA et caractérisation du type A

## RT-PCR en temps réel pour détection et génotypage

Réalisation de ce test à partir des ARN extraits, selon les modes opératoires « Recherche du virus de la fièvre aphteuse par détection du génome viral par RT-PCR en temps réel en une étape et en duplex » et « 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 Lib/Egy) », selon les étapes suivantes :

-préparation de 3 mix selon les tableaux ci-dessous :

Réactifs	Détection pan FA 3D/β-act ou IRES/β-act							
	FA IRES + β-actine				FA 3D + β-actine			
	Volume (μl)		Concentration		Volume (μl)		Concentration	
	nb tubes 9	pour 1 tube	initiale	finale	nb tubes 9	pour 1 tube	initiale	finale
Eau Ultrapure (DNase RNase Free)	12,2	1,4	/		12,2	1,4	/	
Tampon 2X (kit AgPath-ID™)	112,5	12,5	2	1 X	112,5	12,5	2	1 X
Amorce sens	9,0	1,0	10	0,4 μM	9,0	1,0	10	0,4 μM
Amorce antisens	2,7	0,3	100	1,2 μM	9,0	1,0	10	0,4 μM
Sonde FAM-TAMRA	11,3	1,3	5,00	0,25 μM	4,5	0,5	10,00	0,2 μM
Amorce sens β-actine	9,0	1,0	10	0,4 μM	9,0	1,0	10	0,4 μM
Amorce antisens β-actine	9,0	1,0	10	0,4 μM	9,0	1,0	10	0,4 μM
Sonde VIC-TAMRA β-actine	5,4	0,6	5	0,12 μM	5,4	0,6	5	0,12 μM
RT-PCR mix 25X (Enzyme)	9,0	1,0	25	1 X	9,0	1,0	25	1 X
<b>Total à distribuer par puits (μl)</b>	20				20			
<b>Volume ARN à distribuer par puits (μl)</b>	5				5			

Réactifs	Génotypage SAT2 (Lib/Egy) / β-act				
	FA (SAT2 Lib/Egy) + β-actine				
	Volume (μl)		Concentration		
	nb tubes	pour 1 tube	initiale	finale	
	9				
Eau Ultrapure (DNase RNase Free)	10,35	1,15	/		
Tampon 2X (kit AgPath-ID™)	112,5	12,5	2	1	X
Amorce sens	9,0	1,0	20	0,8	μM
Amorce antisens	9,0	1,0	20	0,8	μM
Sonde FAM-TAMRA	6,75	0,75	10	0,3	μM
Amorce sens β-actine	9,0	1,0	10	0,4	μM
Amorce antisens β-actine	9,0	1,0	10	0,4	μM
Sonde VIC-TAMRA β-actine	5,4	0,6	5	0,12	μM
RT-PCR mix 25X (Enzyme)	9,0	1,0	25	1	X
Total à distribuer par puits (μl)	20,00				
Volume ARN à distribuer par puits (μl)	5				

NB: les mix avec les couples amorces/sondes 3D et IRES sont utilisés pour la détection panFA, et le mix avec le couple amorces/sonde SAT2 (séquences fournies par IAH) est utilisé pour la caractérisation des souches circulant actuellement en Egypte et en Libye

-réalisation de l'assemblage (ajout de 5µl d'ARN par échantillon) en incluant, pour chaque mix, un NTC (non template control) et un contrôle positif (ARN de contrôle pour la cible FA et pour la  $\beta$ -actine)

-lancer les rt-PCR en temps réel, après avoir sélectionné les fluorochromes utilisés (FA-TAMRA pour les cibles FA et VIC-TAMRA pour la  $\beta$ -actine), selon les cycles temps/température définis dans les modes opératoires :

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycles
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	

# RT-PCR en temps réel pour détection et génotypage

## Résultats

Analyse des courbes d'amplification et des Ct obtenus pour chaque cible, pour chaque échantillon et pour chaque mix :

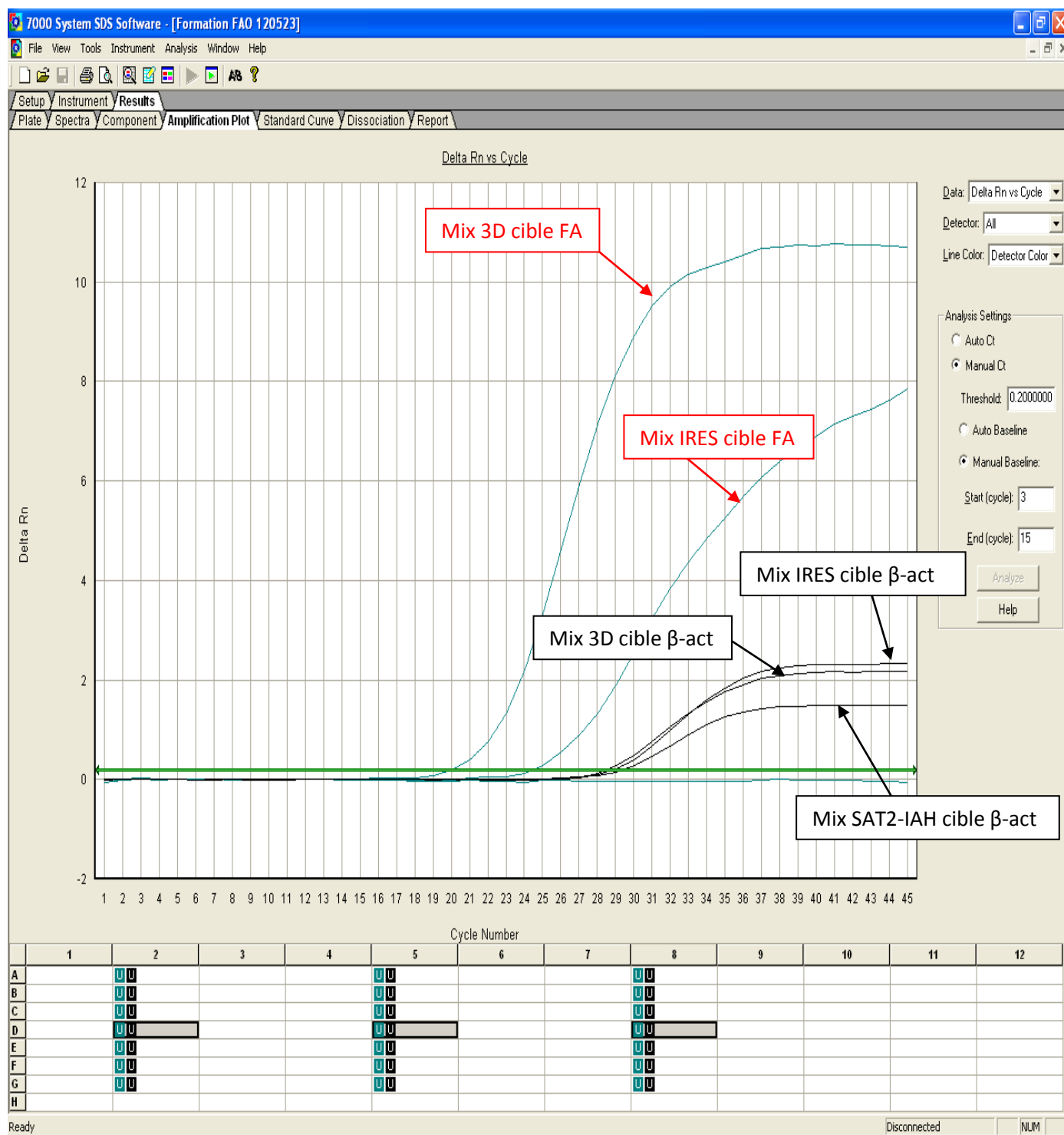
7000 System SDS Software - [Formation FAO 120523]							
File View Tools Instrument Analysis Window Help							
Setup Instrument Results							
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report	
	1	2	3	4	5	6	7
A		NTC 3D U Undet. U Undet.			NTC IRES U Undet. U Undet.		NTC SAT2 IAH U Undet. U Undet.
B		T neg ext 3D U Undet. U Undet.			T neg ext IRES U Undet. U Undet.		T neg ext SAT2 IAH U Undet. U Undet.
C		Ech 1 3D U Undet. U 28.28			Ech 1 IRES U Undet. U 28.22		Ech 1 SAT2 IAH U Undet. U 28.98
D		Ech 2 3D U 20.04 U 28.52			Ech 2 IRES U 24.46 U 28.93		Ech 2 SAT2 IAH U Undet. U 29.40
E		Ech 3 3D U 24.39 U 28.68			Ech 3 IRES U 35.77 U 29.35		Ech 3 SAT2 IAH U Undet. U 30.23
F		Ech 4 3D U 25.26 U 28.65			Ech 4 IRES U 31.28 U 27.63		Ech 4 SAT2 IAH U Undet. U 29.15
G		T+ ARN 3D U 25.48 U 31.28			T+ ARN IRES U 32.79 U 30.03		T+ ARN SAT2 IAH U 33.02 U 31.48

Echantillons	Mix 3D/ $\beta$ -act		Mix IRES/ $\beta$ -act		Mix SAT2(Lib/Egy)/ $\beta$ -act	
	Ct cible 3D	Ct cible $\beta$ -act	Ct cible IRES	Ct cible $\beta$ -act	Ct cible SAT2	Ct cible $\beta$ -act
1	Undet*	28,28	Undet*	28,22	Undet*	28,98
2	20,04	28,52	24,46	28,93	Undet*	29,40
3	24,39	28,68	35,77	29,35	Undet*	30,23
4	25,26	28,65	31,28	27,63	Undet*	29,15

\*Undet = non détecté



Ci-dessous, à titre d'exemple, les courbes d'amplification obtenues pour l'échantillon 2 pour les 3 mix et les 2 cibles :



## RT-PCR en temps réel pour détection et génotypage

### Conclusions

Echantillon	Cible			Conclusions / Observations
	3D pan FA	IRES pan FA	SAT2 Egy/Lib	
1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Génome du virus de la FA non détecté Génome du génotype SAT2 Lib/Egy non détecté
2	Détecté	Détecté	Non détecté	Mise en évidence du génome du virus de la FA Génome du génotype SAT2 Lib/Egy non détecté
3	Détecté	Détecté	Non détecté	Mise en évidence du génome du virus de la FA Génome du génotype SAT2 Lib/Egy non détecté
4	Détecté	Détecté	Non détecté	Mise en évidence du génome du virus de la FA Génome du génotype SAT2 Lib/Egy non détecté

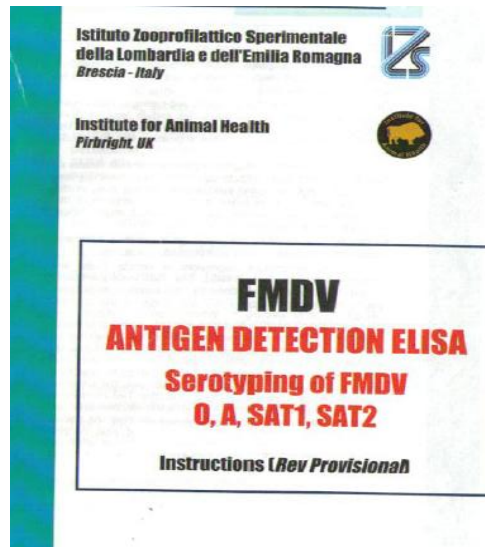
### Mercredi après midi

Cet après midi a été consacré à l'analyse et à l'interprétation des résultats obtenus. De même, une présentation sur l'assurance qualité au laboratoire de diagnostic a été donnée par Labib Bakkali Kassimi.

**Jeudi 24**

## Elisa IZSLER de capture d'antigènes pour sérotypage

Réalisation de ce test, selon le mode opératoire du kit IZSLER (O, A, SAT1, SAT2) à partir de 300µl de surnageant de broyat et à partir de 300µl de cellules IBRS-2 infectées et stockées à -80°C à 21hpi, pour les échantillons 2, 3 et 4, selon les étapes suivantes :



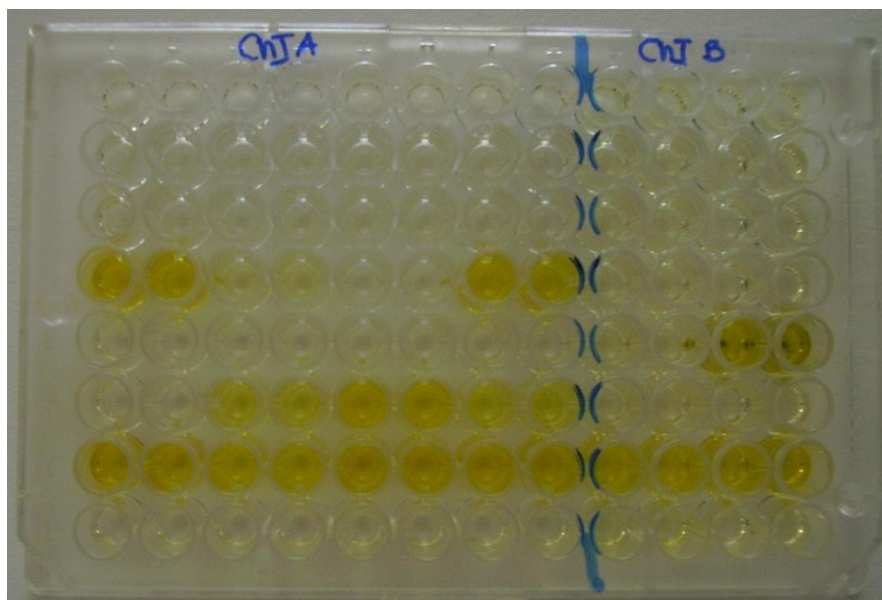
- dilution des échantillons au ½ par ajout de 300µl de tampon de dilution
- incubation 1h à température ambiante (18-30°C)
- laver 3 fois les puits avec 200µl de tampon de lavage 1X (préparé à partir de 15ml de tampon 10X + 135ml d'eau) en incubant 3min entre chaque lavage
- ajout de 50µl/puits de conjugué 1X (préparé extemporanément à partir des conjugués 10X dilués au 1/10 dans du tampon de dilution) (conjugué A colonnes 1 à 8 et conjugué B colonnes 9 à 12)
- incubation 1h à température ambiante (18-30°C)
- laver 4 fois les puits avec 200µl de tampon de lavage 1X en incubant 5min entre chaque lavage
- ajout de 50µl/puits de substrat et incubation 20min à l'obscurité à température ambiante
- ajout de 50µl/puits de solution Stop et lecture de la DO à 450nm

## Elisa IZSLER de capture d'antigènes pour sérotypage

### Résultats

Do brutes à 450nm :

	Sérotype O		Sérotype A				Pan O, A, Asia1		Sérotype SAT1		Sérotype SAT2	
Ech2 broyat	0,034	0,031	0,030	0,036	0,044	0,038	0,044	0,057	0,105	0,123	0,074	0,084
Ech3 broyat	0,065	0,076	0,071	0,071	0,071	0,075	0,067	0,072	0,135	0,122	0,112	0,120
Ech4 broyat	0,055	0,067	0,058	0,061	0,062	0,061	0,061	0,063	0,134	0,127	0,090	0,101
Ech2 isolat	1,838	1,796	0,181	0,188	0,062	0,060	1,816	1,816	0,125	0,125	0,099	0,094
Ech3 isolat	0,052	0,050	0,053	0,052	0,059	0,054	0,057	0,058	0,166	0,139	3,301	3,301
Ech4 isolat	0,050	0,050	0,590	0,578	1,685	1,698	0,649	0,658	0,126	0,126	0,092	0,101
C+	2,295	2,275	1,422	1,434	2,677	2,696	2,437	2,477	1,932	1,738	1,982	2,246
C-	0,054	0,050	0,053	0,054	0,058	0,056	0,058	0,067	0,148	0,152	0,104	0,132



DO corrigées :

	Sérotype O		Sérotype A				Pan O, A, Asia1		Sérotype SAT1		Sérotype SAT2	
Ech2 broyat	-0,020	-0,019	-0,023	-0,018	-0,014	-0,018	-0,014	-0,010	-0,043	-0,029	-0,030	-0,048
Ech3 broyat	0,011	0,026	0,018	0,017	0,013	0,019	0,009	0,005	-0,013	-0,030	0,008	-0,012
Ech4 broyat	0,001	0,017	0,005	0,007	0,004	0,005	0,003	-0,004	-0,014	-0,025	-0,014	-0,031
Ech2 isolat	1,784	1,746	0,128	0,134	0,004	0,004	1,758	1,749	-0,023	-0,027	-0,005	-0,038
Ech3 isolat	-0,002	0,000	0,000	-0,002	0,001	-0,002	-0,001	-0,009	0,018	-0,013	3,197	3,169
Ech4 isolat	-0,004	0,000	0,537	0,524	1,627	1,642	0,591	0,591	-0,022	-0,026	-0,012	-0,031
C+	2,241	2,225	1,369	1,380	2,619	2,640	2,379	2,410	1,784	1,586	1,878	2,114

Puits positifs    Puits douteux    Puits négatifs

## Elisa IZSLER de capture d'antigènes pour sérotypage

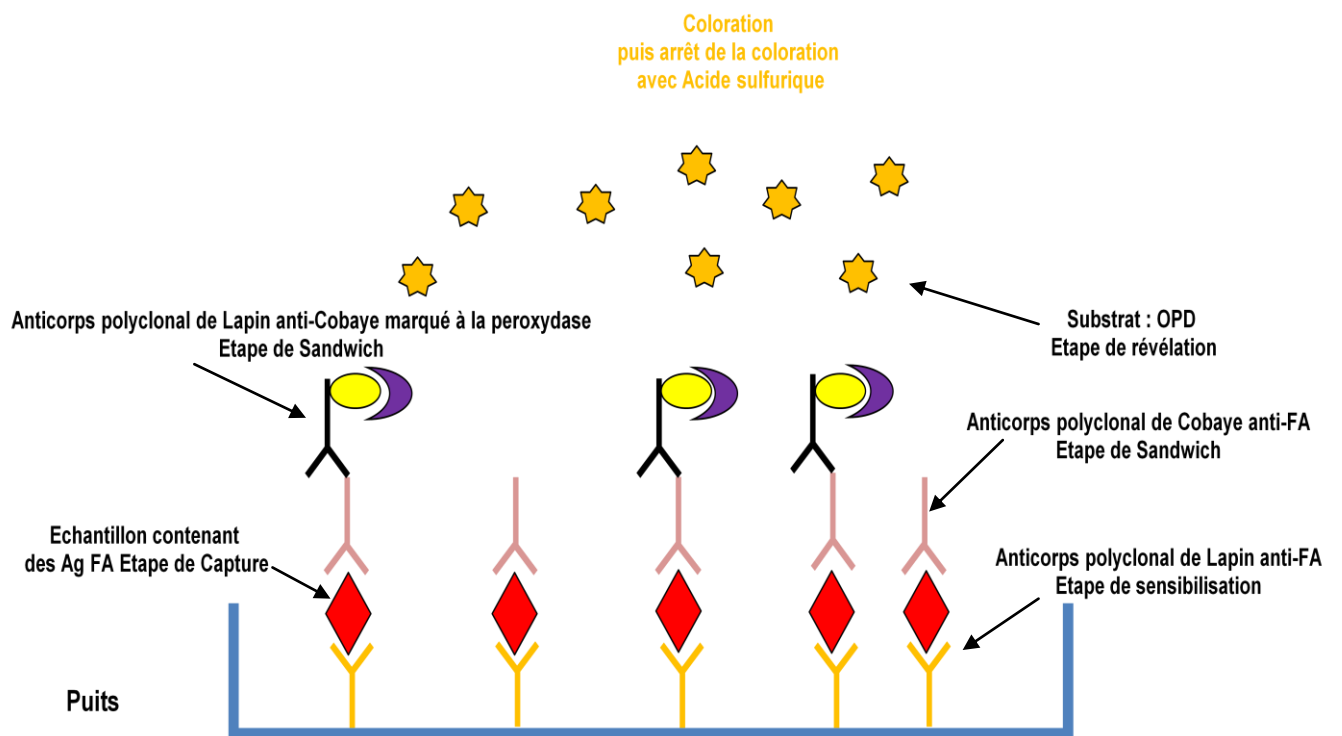
### Conclusions

Echantillon	Conclusions / Observations
Ech2 broyat	Ag de la FA non détecté
Ech3 broyat	Ag de la FA non détecté
Ech4 broyat	Ag de la FA non détecté
<b>Ech2 isolat</b>	<b>Détection d'Ag du sérotype O de la FA</b>
<b>Ech3 isolat</b>	<b>Détection d'Ag du sérotype SAT2 de la FA</b>
<b>Ech4 isolat</b>	<b>Détection d'Ag du sérotype A de la FA</b>

Le test ELISA IZSLER de capture d'antigènes est utilisé pour détecter et sérotyper le virus. Ce test peut être réalisé directement sur le broyat d'un échantillon de terrain à condition que cet échantillon contienne suffisamment de virus. En cas de résultat négatif sur broyat, Il est important d'isoler le virus sur culture cellulaire puis de réaliser l'ELISA IZSLER sur l'isolat.

## Elisa IAH de capture d'antigènes pour sérotypage

Réalisation de ce test, selon le mode opératoire « Recherche des antigènes du virus de la fièvre aphteuse par ELISA de capture (sandwich) indirect » à partir de 1200µl de surnageant de broyat pour l'échantillon 4 et à partir de 1200µl de cellules IBRS-2 infectées à stockées à -80°C à 21hpi, pour les échantillons 2, 3 et 4, selon le schéma suivant :



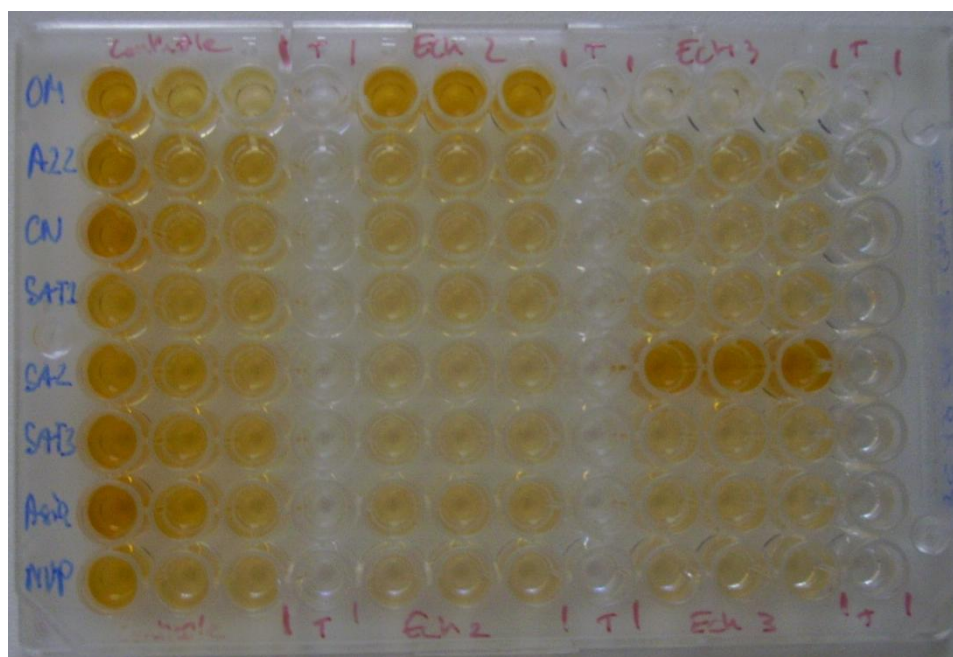
*Les concentrations de chaque réactif utilisé, les étapes de lavage et les temps d'incubation sont détaillés dans le mode opératoire.*

## Elisa IAH de capture d'antigènes pour sérotypage

### Résultats

DO brutes plaque 1 :

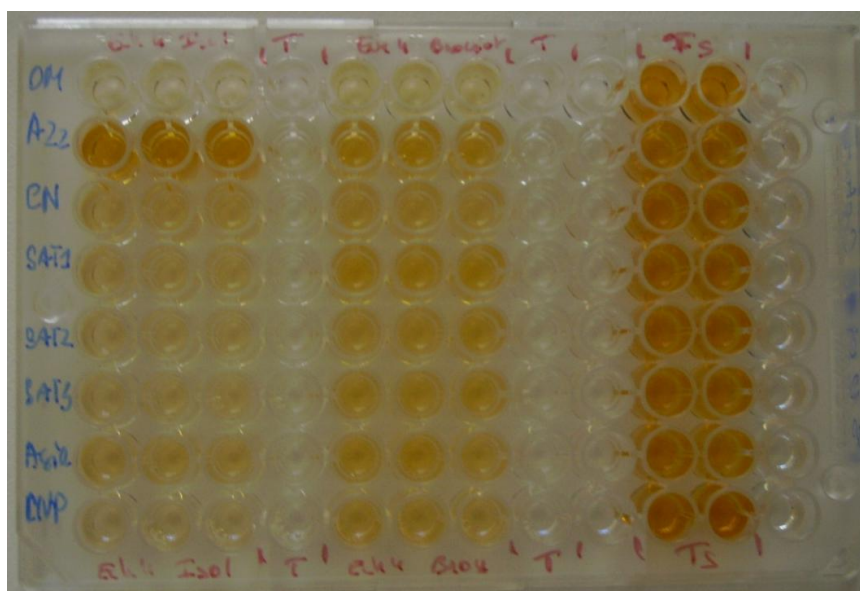
Sérotypes	Ag C+ 1/5	Ag C+ 1/25	Ag C+ 1/125	Témoin négatif	Ech2 isolat			Témoin négatif	Ech3 isolat			Témoin négatif
O	1,431	0,633	0,348	0,036	1,410	1,436	1,351	0,039	0,160	0,152	0,157	0,040
A5/22/24	1,397	0,710	0,722	0,066	0,441	0,469	0,446	0,066	0,415	0,428	0,432	0,065
C Noville	1,933	0,824	0,481	0,059	0,376	0,361	0,349	0,061	0,289	0,277	0,291	0,059
SAT1	0,893	0,613	0,555	0,058	0,317	0,360	0,343	0,057	0,373	0,343	0,352	0,040
SAT2	1,317	0,853	0,545	0,059	0,234	0,253	0,277	0,057	1,884	1,876	2,250	0,059
SAT3	1,741	0,889	0,597	0,058	0,268	0,273	0,283	0,058	0,330	0,318	0,315	0,057
Asia1	2,119	1,023	0,542	0,060	0,358	0,373	0,379	0,057	0,329	0,353	0,306	0,058
MVP	1,112	0,477	0,392	0,059	0,222	0,267	0,270	0,061	0,250	0,251	0,263	0,058





DO brutes plaque 2 :

Sérotypes	Ech4 isolat			Témoin négatif	Ech4 broyat			Témoin négatif		Témoin de sensibilisation		
O	0,130	0,139	0,135	0,036	0,228	0,227	0,222	0,051		1,914	1,947	
A5/22/24	1,636	1,782	1,607	0,068	0,784	0,784	0,719	0,072		1,924	2,034	
C Noville	0,330	0,341	0,370	0,060	0,497	0,461	0,436	0,058		2,277	2,157	
SAT1	0,286	0,292	0,298	0,059	0,710	0,655	0,693	0,057		2,118	2,165	
SAT2	0,235	0,245	0,250	0,062	0,485	0,508	0,595	0,058		2,069	2,151	
SAT3	0,241	0,254	0,258	0,059	0,545	0,556	0,576	0,061		2,115	2,027	
Asia1	0,381	0,388	0,361	0,060	0,588	0,628	0,484	0,057		2,140	1,846	
MVP	0,196	0,196	0,192	0,067	0,490	0,477	0,402	0,063		2,246	2,468	



Bilan des DO corrigées moyennes par échantillon et par sérotype :

Sérotype	Ech2 isolat	Ech3 isolat	Ech4 isolat	Ech4 broyat
O	1,359	0,116	0,094	0,185
A5/22/24	0,385	0,358	1,608	0,695
C Noville	0,303	0,226	0,288	0,405
SAT1	0,286	0,302	0,238	0,632
SAT2	0,196	1,944	0,184	0,470
SAT3	0,216	0,262	0,192	0,500
Asia1	0,312	0,271	0,318	0,508
MVP	0,191	0,193	0,133	0,395

Elisa IAH de capture d'antigènes pour sérotypage  
Conclusions

Echantillon	Conclusions / Observations
<b>Ech2 isolat</b>	<b>Détection d'Ag du sérotype O de la FA</b>
<b>Ech3 isolat</b>	<b>Détection d'Ag du sérotype SAT2 de la FA</b>
<b>Ech4 isolat</b>	<b>Détection d'Ag du sérotype A de la FA</b>
Ech4 broyat	Ag de la FA non détecté

Pour les échantillons 2, 3 et 4 d'isolat (issus de cellules IBRS-2 infectées) l'analyse des DO corrigées moyennes et de leur différence en fonction du sérotype recherché permettent de statuer sans hésitation sur le sérotype présent dans l'échantillon.

Pour l'échantillon 4 de surnageant de broyat, l'analyse des DO corrigées moyennes ne permet pas de statuer sur le sérotype présent dans l'échantillon. En effet, leur différence en fonction du sérotype recherché n'est pas suffisamment significative pour conclure.

Le test ELISA IAH de capture d'antigènes est utilisé pour détecter et sérotyper le virus. Ce test peut être réalisé directement sur le broyat d'un échantillon de terrain à condition que cet échantillon contienne suffisamment de virus. En cas de résultat négatif sur broyat, Il est important d'isoler le virus sur culture cellulaire puis de réaliser l'ELISA IAH sur l'isolat.

## Bilan des résultats obtenus par les différentes méthodes appliquées sur les 4 échantillons d'épithéliums

Tableau de synthèse des résultats :

Ech	Svanodip	Isolement viral	Rt-PCR classique					Rt-PCR temps réel			ELISA Ag IZSLER	ELISA Ag IAH
			Détection		Génotypage			3D pan FA	IRES pan FA	SAT2 Lib/Egy		
			3D pan FA	SAT2 Lib/Egy	O	A	Asia					
1	Négatif	Faire un 2 <sup>nd</sup> passage	Génome du virus de la FA non détecté					Génome du virus de la FA non détecté		Génome du génotype SAT2 Egy/Lib non détecté	/	/
2	Douteux	ECP à 25hpi	Détection du génome de la FA et caractérisation du type O					Détection du génome de la FA			Détection d'Ag du sérotype O de la FA	
3	Douteux	ECP à 25hpi	Détection du génome de la FA sans caractérisation du type					Détection du génome de la FA			Détection d'Ag du sérotype SAT2 de la FA	
4	Douteux	ECP à 25hpi	Détection du génome de la FA et caractérisation du type A					Détection du génome de la FA			Détection d'Ag du sérotype A de la FA	

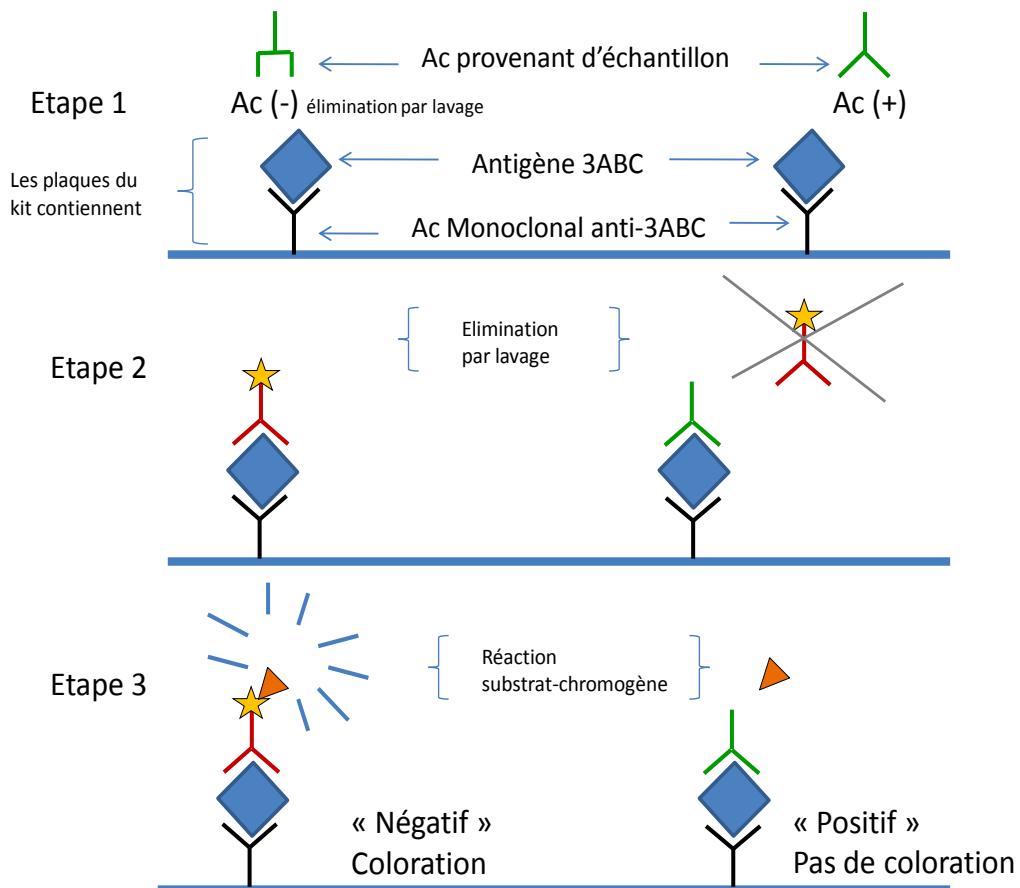
### Pour conclure sur le statut de ces 4 échantillons d'épithélium :

- l'échantillon 1 est un épithélium ne contenant pas le virus de la fièvre aphteuse
- l'échantillon 2 est un épithélium infecté par le sérotype O de la fièvre aphteuse
- l'échantillon 3 est un épithélium infecté par le sérotype SAT2 de la fièvre aphteuse, mais pas par une souche SAT2 similaire à celle circulant actuellement en Egypte et en Libye
- l'échantillon 4 est un épithélium infecté par le sérotype A de la fièvre aphteuse

Dans le cas d'analyse d'échantillons de terrains (et non d'échantillons de laboratoires artificiellement contaminés au cours de cet atelier), pour pouvoir formuler une conclusion définitive, il faut aussi prendre en compte le contexte épidémiologique de la région où circulent les animaux prélevés ainsi que les signes cliniques observés.

## Elisa NSP Priocheck pour la recherche d'anticorps spécifiques des protéines non structurales de la fièvre aphteuse (jeudi 24 et vendredi 25/05/2012)

Réalisation de ce test, selon le mode opératoire « Recherche des anticorps spécifiques des protéines non structurales du virus de la fièvre aphteuse par ELISA PrioCHECK®FMDV-NS» à partir de 9 échantillons de sérums de terrains (caprins, ovins, bovins, porcins) détenus par le laboratoire de Maisons-Alfort, selon le schéma suivant :



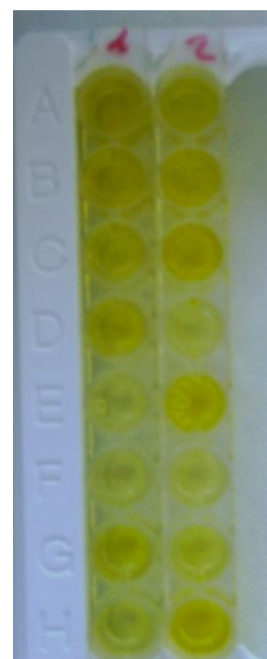
*Les concentrations de chaque réactif utilisé, les étapes de lavage et les temps d'incubation sont détaillés dans le mode opératoire.*

# Elisa NSP Priocheck pour la recherche d'anticorps spécifiques des protéines non structurales de la fièvre aphteuse

## Résultats

Résultats bruts :

Echantillons	DO brutes	Echantillons	DO brutes
Contrôle négatif	1,744	Ech B	0,944
Contrôle négatif	1,817	Ech C	1,239
Contrôle positif faible	0,690	Ech D	1,422
Contrôle positif faible	0,684	Ech E	0,361
Contrôle positif fort	0,292	Ech F	1,717
Contrôle positif fort	0,292	Ech G	0,360
Contrôle interne	0,684	Ech H	0,542
Ech A	0,380	Ech I	1,757



Récapitulatif des résultats par échantillon et calcul du pourcentage d'inhibition :

Echantillons		DO brutes à 450nm	% d'inhibition	Résultat
N° interne	espèce			
A	Caprin	0,380	79	+
B	Bovin	0,944	47 <sup>(*)</sup>	- <sup>(*)</sup>
C	Ovin	1,239	30	-
D	Porcin	1,422	20	-
E	Bovin	0,361	80	+
F	Bovin	1,717	4	-
G	Porcin	0,360	80	+
H	Porcin	0,542	70	+
I	Ovin	1,757	1	-

<sup>(\*)</sup> pour l'échantillon B, le pourcentage d'inhibition étant compris en 45% et 55% (soit dans la fourchette de valeurs prenant en compte le coefficient de variations intra plaque), nous avons confirmé le résultat négatif en faisant le calcul du pourcentage d'inhibition avec chacune des valeurs de DOmax prise indépendamment.

Elisa NSP Priocheck pour la recherche d'anticorps spécifiques des  
protéines non structurales de la fièvre aphteuse  
Conclusions

Echantillons		Conclusions / Observations
N° interne	espèce	
A	Caprin	Animal infecté
B	Bovin	Animal non infecté
C	Ovin	Animal non infecté
D	Porcin	Animal non infecté
E	Bovin	Animal infecté
F	Bovin	Animal non infecté
G	Porcin	Animal infecté
H	Porcin	Animal infecté
I	Ovin	Animal non infecté

L'obtention de tels résultats ne peut mener à une conclusion définitive sur le statut de chaque échantillon analysé, qu'à conditions d'être confirmés par d'autres méthodes.

Ce test est un test de groupe et non d'individu. Dans le cas où une vaccination est pratiquée, il est important de connaître les modalités de vaccination appliquées et le type de vaccin utilisé dans la région où les animaux ont été prélevés pour pouvoir donner une interprétation rationnelle des résultats de ce test.

## Test supplémentaires réalisés au cours de l'atelier

### Svanodip :

Réalisé à partir d'une suspension virale concentrée

Résultat positif observé dès la 1<sup>ère</sup> lecture à 10min



### Isolement viral :

Réalisé à partir d'une suspension virale concentrée

ECP observé dès 4hpi

