

Maisons-Alfort, le 19 mai 2003

AVIS

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments concernant le dépistage rapide des ESST chez les petits ruminants

Considérant que l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été saisie le 14 novembre 2002 par la Direction Générale de l'Alimentation d'une demande d'avis concernant les modalités de mise en place, sur le terrain, des tests de dépistage des ESST chez les petits ruminants;

Considérant que cette demande d'avis concerne notamment l'existence d'éléments scientifiques susceptibles de mettre en évidence une différence significative de sensibilité entre les deux tests actuellement utilisés en France chez les petits ruminants;

I Le contexte

Considérant que la DGAI a mis en place dès 2002, conformément au règlement européen (CE) 999/2001, un programme de dépistage de la tremblante à grande échelle en abattoir et en équarrissage;

Considérant que sont actuellement utilisés, dans le cadre de ce programme, les tests Prionics Check Western Blot et BioRad PlateLIA, agréés en juillet 1999 par la Commission Européenne pour le dépistage de l'ESB chez les bovins;

Considérant que dans son avis du 15 février 2002 relatif au protocole de l'enquête par sondage prévu pour les petits ruminants le comité avait écrit qu'il était « *indispensable de se limiter à un seul test pour réaliser ce programme....Dans une étude de prévalence organisée spécifiquement, on choisit toujours une et une seule méthode de mesure (et pas plusieurs)* »;.

Considérant que, sur les performances respectives de deux tests Prionics Check Western Blot et BioRad PlateLIA, l'Agence a rendu un avis en date du 31 mai 2002¹, fondé sur un avis du Comité d'experts spécialisé sur les ESST en date du 22 mai 2002, qui estimait que « *le choix optimal sur le critère de la performance du dépistage est de retenir le test ayant la meilleure sensibilité analytique, c'est à dire le test Biorad. Les données scientifiques suggèrent en effet que, chez les petits ruminants, cette meilleure sensibilité analytique devrait se traduire par une meilleure sensibilité en terme de dépistage* ». Cet avis recommandait, en conséquence « *que la surveillance active des ESST chez les petits ruminants, initiée avec deux tests, soit poursuivie, dès que possible, avec un seul test, à savoir celui présentant la meilleure sensibilité analytique* »;

27 - 31, avenue
du Général Leclerc
B.P. 19 . 94701
Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 50
Fax 01 49 77 90 05
www.afssa.fr

REPUBLICA
FRANCAISE

¹ Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments concernant le choix entre les tests de dépistage des ESST chez les petits ruminants

Considérant que le Comité a de nouveau été saisi par l'Agence le 27 novembre 2002 sur la comparaison des performances de ces deux tests chez les petits ruminants. Le Comité a rendu, à ce sujet, un avis provisoire en date du 17 février 2003 qui précisait que «*les données disponibles à cette date ne modifient pas son avis du 22 mai 2002*», en attirant toutefois l'attention sur le fait que «*dans un délai proche (mars 2003) des données nouvelles devraient permettre une analyse plus exhaustive*»;

II Analyse scientifique

Considérant que, depuis son avis du 31 mai 2002, l'Agence dispose de nouvelles données relatives aux performances des différents tests de dépistages des ESST chez les petits ruminants, qui proviennent de leur utilisation sur le terrain, de protocoles scientifiques ou d'études indépendantes réalisées par les sociétés commercialisant ces tests. L'évaluation scientifique de l'Agence s'est toutefois fondée uniquement sur les éléments permettant une comparaison directe de la sensibilité analytique d'un test par rapport à l'autre, et qui sont les suivants :

- les résultats du programme de dépistage en abattoir et en équarriSSage pour l'année 2002. Les données issues de ce programme ont notamment montré l'existence de cas de tremblante pour lesquels des discordances de résultats ont été observés entre les deux tests rapides de dépistage (Afssa Lyon);
- l'étude de la cinétique d'accumulation de la PrP-res au sein de différents organes, réalisée chez des animaux en cours d'incubation à l'aide des deux tests (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse);

Considérant que l'ensemble de ces données a été soumis à l'analyse du comité d'experts spécialisé sur les ESST qui a rendu, le 9 mai 2003, l'avis définitif suivant::

«*Le Comité d'Experts Spécialisé sur les ESST a été consulté le 27 novembre 2002, dans le cadre d'une saisine sur une demande d'avis, sur deux questions relatives aux choix de tests rapides utilisables dans le cadre du dépistage des ESST chez les petits ruminants :*

1) Compte tenu de l'état des connaissances scientifiques actuelles et de l'avis du Comité Scientifique Directeur récemment publié à propos des pré-requis relatifs aux performances des futurs tests candidats à une évaluation pour le dépistage des ESST des petits ruminants, le Comité est-il en mesure de faire des recommandations hiérarchisées sur les différents tests disponibles ?

Le document cité est un protocole expérimental général, approuvé par le CSD, et rédigé en vue d'une évaluation à venir des tests rapides chez les petits ruminants. Ce document n'apporte aucune donnée scientifique ou technique supplémentaire sur les performances comparées des tests rapides dans ces espèces. Le Comité considère ainsi que les informations du document cité, qui doivent être complétées par un

programme plus détaillé, ne sont pas de nature à permettre des recommandations hiérarchisées sur les différents tests disponibles.

2) S'agissant du test à privilégier pour le dépistage des ESST chez les petits ruminants et compte tenu de la recommandation antérieure du Comité de n'utiliser qu'un seul test, l'analyse intermédiaire issue de ce dépistage actif est elle de nature à modifier l'avis de l'Agence du 31 mai 2002 ? Depuis cet avis, et indépendamment des enseignements éventuels du programme par sondage, existe-t-il des éléments scientifiques nouveaux relatifs à la comparaison des tests Prionics et Biorad ?

Dans son avis du 15 février 2002 relatif au protocole de l'enquête par sondage prévue chez les petits ruminants, et désormais pratiquement achevée, le Comité avait écrit qu'il était " indispensable, de se limiter à un seul test pour réaliser ce programme " et que " il serait utile qu'une étude de sensibilité analytique² des tests disponibles portant sur le dépistage des ESST chez les petits ruminants soit réalisée rapidement pour guider le choix sur des arguments ... objectifs ... ".

Dans un second avis en date du 22 mai 2002, le Comité, sur la base de l'étude de la sensibilité analytique¹ des tests Biorad et Prionics par le laboratoire de référence de l'AFSSA-Lyon et en fonction de différents considérants i) confirmait la nécessité d'utiliser un seul test pour la réalisation de l'enquête de prévalence chez les petits ruminants ii) retenait le choix du test possédant la meilleure sensibilité analytique¹, c'est à dire le test Biorad.

Depuis cette date, de nouvelles données ont été rendues disponibles :

- 1) *étude de la cinétique d'accumulation de la PrPres détectée par les deux tests chez des animaux en cours d'incubation (rapport dans l'annexe 1),*

Les résultats démontrent que la meilleure sensibilité analytique du test Biorad permet une détection plus précoce de la PrPres dans le système nerveux central, montrant ainsi que la différence de seuil de détection de la PrPres entre les tests est dans une gamme pertinente vis à vis des concentrations physiopathologiques,

- 2) *analyse par l'autre test des échantillons trouvés positifs par l'un des tests de dépistage dans le cadre du programme de surveillance active, permettant de préciser la fréquence des discordances entre ces tests à l'échelon individuel (rapport dans l'annexe 2)*

Les résultats montrent une nette différence de capacité à identifier les animaux naturellement infectés :

- *sur une série de 70 échantillons trouvés positif par le test Biorad, 51 ont été également trouvés positifs par le test Prionics et confirmés par la technique de Western blot de référence,*
- *en revanche, les 19 autres échantillons de cette série (18 moutons et une chèvre) se sont révélés négatifs à la fois par la technique de Western blot de*

² Sensibilité analytique : concentration minimale de PrPres détectée, mesurée par la dilution maximale trouvée positive à partir d'un homogénat de matériel biologique infecté

référence et par le test Prionics. Ces 19 échantillons ont été confirmés positifs par examen immunohistochimique, démontrant donc un avantage de sensibilité du test Biorad par rapport au Western Blot de référence et au test Prionics. Ces 19 échantillons se sont révélés négatifs par le test Prionics de façon répétée, y compris lors d'analyse d'un homogénat cérébral de chacun de ces échantillons trouvés positifs par le test Biorad. Le niveau de positivité par le test Biorad de ces homogénats est souvent élevé, dans 10 cas sur 17 supérieur à 10 fois le seuil de positivité du test Biorad.

- par ailleurs, sur une série de 99 échantillons initialement trouvés positifs par le test Prionics aucune discordance n'est apparue avec le test de Western blot de référence, ce qui suggère une absence de différence de sensibilité entre ces deux tests.

3) analyse des résultats obtenus par chacun des deux tests de dépistage dans le cadre de l'enquête de prévalence en cours, confrontée aux résultats obtenus par les tests biochimiques ou/et immunohistochimiques de confirmation, dans les limites de la comparabilité des populations de petits ruminants étudiées par chacun des tests

Le programme de surveillance n'ayant pas été conçu pour répondre à cette question, les différences de populations d'animaux étudiés par les laboratoires utilisant l'un ou l'autre test ne permettent pas de conclure sur la sensibilité comparée des deux tests au regard des données brutes qui indiquent un taux supérieur d'animaux retrouvés positifs avec le test Biorad : En effet, cette différence peut s'expliquer par plusieurs facteurs confondants, au nombre desquels le fait que le test Biorad soit utilisé dans des régions plus fortement atteintes de tremblante, et par le nombre d'animaux testés par troupeau. Une première analyse tend à montrer que les différences observées dans le taux de positifs selon le test utilisé changent profondément après prise en compte de ces deux facteurs. Il convient donc d'analyser complètement ces données, sans certitude d'aboutir à une conclusion claire quant à la performance relative des deux tests.

En conclusion, le Comité considère que les données désormais disponibles confortent son avis du 22 mai 2002 et conduisent à privilégier le test Biorad pour la réalisation du sondage à réaliser en 2003.»

IV Conclusions

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que, comme il est conclu par le Comité d'experts spécialisé sur les ESST qu'elle a de nouveau interrogé sur la comparaison des tests, et conformément aux recommandations formulées dans l'avis du 31 mai 2002, il justifié, pour des raisons scientifiques, que le programme de surveillance active des ESST chez les petits ruminants soit conduit uniquement à l'aide du test commercialisé par la société BioRad.

Martin HIRSCH

Annexe 1

Comparaison des tests

BioRad® TeSeE et TeSeE Petits Ruminants et Prionics®
Check Western pour la détection de la PrPres,
à partir d'échantillons de tissus lymphoïdes et de moelle
épinière d'ovins à différents stades d'incubation de
tremblante

30 avril 2003

G. Tabouret, O. Andreoletti, G. Foucras, C. Lacroux, F. Schelcher

UMR INRA-ENVT 1225 Interactions Hôte - Agents Pathogènes
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex 03

Comparaison des tests

**BioRad® TeSeE et TeSeE Petits Ruminants et Prionics® Check
Western pour la détection de la PrPres,
à partir d'échantillons de tissus lymphoïdes et de moelle épinière
d'ovins à différents stades d'incubation de tremblante**

30 avril 2003

G. Tabouret, O. Andreoletti, G. Foucras, C. Lacroix, F. Schelcher

UMR INRA-ENVT 1225 Interactions Hôte - Agents Pathogènes
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex 03

Sommaire	
Résumé	page 3
1-Objectifs	page 4
2-Matériel biologique	page 4
a- Tissu lymphoïde	page 4
b- Moelle épinière	page 4
3-Immunohistochimie	page 5
4- Détection de la PrPres	page 5
a- Préparation d'un homogénat stock	page 5
b- Traitements des homogénats et immunodétection	page 5
c- Techniques BioRad	page 5
d- Technique Prionics	page 6
5-Résultats	page 7
a- Tissus lymphoïdes des VRQ/VRQ	page 7
b- Moelle épinière des VRQ/VRQ	page 8
6-Discussion	page 9
7-Conclusions	page 10
Annexe	page 11

Résumé

L'objectif de cette étude était de comparer les tests Prionics® (Check Western) et BioRad (micro-méthodes TeSeE® et TeSeE® Petits Ruminants) entre eux, et à une technique de référence, l'immunohistochimie, pour la détection de la PrPres/PrPsc.

Les échantillons ont été choisis afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de sensibilité analytique, en relation avec la cinétique de dissémination dans l'organisme.

Les ovins, de race romanov, de génotypes VRQ/VRQ et ARR/X, exposés naturellement à la tremblante, ont été prélevés séquentiellement, pour les échantillons de tissus lymphoïdes ($n=89$) (rate, plaques de peyer iléales, noeuds lymphatiques mésentériques, amygdales, noeud lymphatique cervical superficiel) à 10, 21, 70, 100 et 140 jours d'âge, et pour les échantillons de moelle épinière ($n=103$) (cervicale, thoracique et lombaire) à 10, 13, 16, et 23 mois d'âge.

Les différents tests biochimiques ont été évalués à partir d'un seul et unique homogénat tissulaire stock, en respectant rigoureusement le protocole d'analyse recommandé par le fabricant.

Les résultats obtenus suggèrent une plus grande précocité de détection de la PrPres pour les tests Biorad TeSeE et surtout Biorad TeSeE OV, par rapport au test Prionics Check Western, aussi bien à partir des échantillons de tissus lymphoïdes que de moelle épinière, prélevés à différents stades d'incubation de la tremblante.

Par rapport à la méthode immunohistochimique prise comme référence, la concordance des résultats pour les tests Biorad TeSeE® et surtout TeSeE®OV, s'est avérée supérieure à celle de la méthode Prionics Check Western, aussi bien à partir des échantillons de tissus lymphoïdes que de moelle épinière.

1. Objectifs

A la demande de l'AFSSA, cette étude a été menée avec l'objectif de comparer les tests Prionics® (Check Western) et BioRad (micro-méthode TeSeE® et TeSeE® Petits Ruminants ou TeSeE®Ov) pour la détection de la PrPres, et de comparer ces trois tests à une technique de référence de détection de la PrPsc, l'immunohistochimie.

Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences dans la sensibilité de détection, l'étude a été conduite sur des échantillons tissulaires lymphoïdes et de moelle épinière, prélevés sur des ovins en phase d'incubation de tremblante.

Afin de favoriser la comparaison des tests de détection de la PrPres, l'ensemble des spécimens a été traité

- 1) de façon à ce qu'un même homogénat stock soit utilisé pour les trois méthodes
- 2) avec le matériel recommandé par les sociétés productrices des tests
- 3) selon le protocole recommandé par la notice des tests ou le cas échéant en plein accord avec les industriels en charge du développement de ces tests.

2. Matériel Biologique

L'ensemble des échantillons provient d'ovins, de race romanov (domaine INRA-Langlade, 31 Pompertuzat), naturellement exposés à la tremblante. Des animaux de génotypes VRQ/VRQ et ARR/X ont été inclus.

a. Tissus lymphoïdes

Des groupes d'agneaux (4 VRQ/VRQ et 1 ARR/X) de la même cohorte de naissance, ont été euthanasiés à 10, 21, 70, 100 et 140 jours d'âge.

Ont été prélevés des échantillons des plaques de Peyer iléales, des nœuds lymphatiques mésentériques et préscapulaires, de la rate, et des amygdales.

Au moment du prélèvement, les échantillons ont été divisés en deux parties égales ; la première a été fixée dans une solution de formol tamponné à 10% pour traitement immunohistochimique ultérieur, alors que la seconde a été congelée à -80°C, en attente de la détection de PrPres.

b. Moelle épinière

Des groupes d'agneaux (3 VRQ/VRQ et 1 ARR/X) de la même cohorte de naissance, ont été euthanasiés à 10, 13, 16, 19 et 23 mois d'âge.

Ont été prélevés des échantillons de moelle épinière, avec deux segments cervicaux, deux segments thoraciques, et deux segments lombaires.

Ces prélèvements ont été conditionnés de façon similaire à celle décrite pour les tissus lymphoïdes.

3. Immunohistochimie

Les marquages PrPsc ont été effectués à l'aide de l'anticorps monoclonal de souris 8G8 (IgG2a, dilution 1/2000 - ascite), dirigé contre la protéine PrP recombinante humaine et reconnaissant spécifiquement la séquence en acide aminés 95-108 (gracieusement fourni par J.Grassi du CEA Saclay, France) (Krasemann *et al*, 1996) et l'anticorps 2G11 (IgG2a, dilution 1/350 – ascite) dirigé contre le peptide 146-182 de la PrP ovine (J. Grosclaude INRA-VIM, Jouy en Josas, France) (Andréoletti *et al*, 2000).

4. Détection de la PrPres

a. Préparation des homogénats - stock

Après décongélation, les échantillons ont été parés (élimination du tissu adipeux) puis pesés au mg près. Des fragments de tissu compris entre 100 et 700 mg (variable en fonction de la nature du tissu échantillonné) ont été homogénéisés dans de l'eau ultrapure 18 mégohms (homogénat à 20%-rapport w:v de 5) selon le procédé recommandé par Prionics® (tube Prypcon à ailettes modifiées pour le broyage des tissus lymphoïdes et tubes Prypcon à ailettes simples pour le tissu nerveux). L'homogénat obtenu a servi de suspension-stock pour la réalisation des tests biochimiques.

b. Traitement des homogénats et immuno-détection

Les étapes détaillées des protocoles sont présentées en annexe 1

c. Techniques Biorad

500 µL de la suspension stock ont été transférés dans des tubes à ribolyser contenant 500 µL de solution glucosée à 10% et soumis à un cycle de ribolyse (vitesse 6.5 pendant 45 secondes).

Les suspensions ont alors été calibrées (à l'aide des seringues et aiguilles de calibration du Kit) et réparties en plaque de 96 puits, à raison de 700 µL par puits.

La digestion par la protéinase K, en tampon A ou A', selon le test utilisé (TeSeE ou TeSeOV) l'incubation à 37°C ainsi que la précipitation des protéines, ont été réalisées par un système automatisé (NSP). Après centrifugation, les culots protéiques ont été repris dans 50 µL de tampon C et dénaturés pendant 5 minutes à 100°C. Les culots dissociés ont finalement été dilués dans 125 µL de réactif R6.

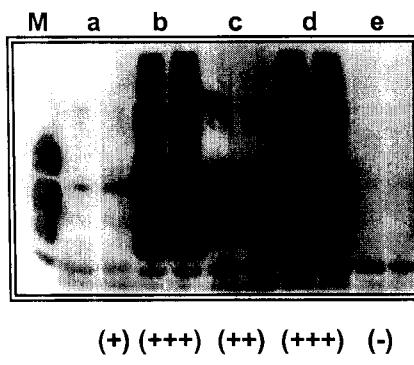
100µL des échantillons ont été testés avec les plaques TeSeE pour les échantillons digérés en tampon A et TeSeEOV pour les échantillons digérés en tampon A'. Les contrôles négatifs (quatre puits) et positifs (deux puits) du kit ont été déposés sur chaque plaque. Les protocoles d'immunodétection et de révélation (temps et température d'incubation, lavages) correspondent à ceux recommandés par la notice du test.

La D.O. seuil, retenue pour l'interprétation des résultats correspond aux recommandations du fabricant : fixée à la moyenne des valeurs des 4 négatifs additionnée de 0.090 (valeur ajoutée aux prélèvements issus d'équarrissage) .

d. Technique Prionics

250 µL de l'homogénat stock ont été transférés en microtube de 1.5 ml puis additionné de 250 µL de Tampon d'Homogénéisation concentré 2x fourni dans le kit. Les étapes de digestion PK, de concentration, de précipitation et de dénaturation des culots sont celles de la notice. 10 µL de solution protéique dénaturée ont été déposés sur le gel (NuPage, Invitrogen) en double puis soumis à une électrophorèse des protéines (200 V, 30 minutes) selon les recommandations du fabricant. Sur chaque gel un contrôle positif (PrPc fournie dans le kit) a été déposé de façon à optimiser les temps d'exposition du film autoradiographique, vérifier l'efficience de l'électro-transfert et faciliter l'interprétation des profils protéiques obtenus. Les étapes d'électro-transfert et de révélation ont été effectuées selon les recommandations de la notice. L'interprétation a été réalisée par deux lecteurs indépendants. Les échantillons à profil protéique présentant un shift de poids moléculaire (par rapport au contrôle positif) et comportant au moins les bandes diglycosylée et monoglycosylée ont été déclarés positifs.

Exemple : gel obtenu le 4 Mars 2003 pour les plaques de Peyer testé par Prionics® Check Western



5. Résultats

Les résultats individuels sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Lorsque les quantités d'homogénats stocks disponibles n'étaient pas assez importantes, les tests biochimiques n'ont pas été réalisés(notés ND).

Les tissus prélevés sur les animaux ARR/X ou ARR/ARR sont restés négatifs quelle que soit la méthode de détection utilisée.

a. Tissus lymphoïdes des VRQ/VRQ

A 10 jours, aucun des 4 tests n'a mis en évidence de PrPres ou de PrPsc; dans les tissus prélevés.

A 21 jours, les tests ont mis en évidence de la PrPres dans la Plaque de Peyer iléale de l'animal 28, mais seul le test Biorad TeSeOV s'est avéré positif pour la plaque de Peyer iléale de l'animal 31.

A 70 jours les quantités d'homogénats stocks disponibles étant faibles, de nombreux échantillons n'ont pu être testés par l'ensemble des méthodes.

Le tableau suivant permet de comparer les résultats obtenus. Seuls les cas où l'ensemble des résultats pour les quatre tests étaient disponibles, ont été utilisés pour construire ce tableau.

			TeSeE +	TeSeE -	TeSeE Ov +	TeSeE Ov -
IHC+	Prionics +	27	27	0	27	0
	Prionics -	6	4	2	5	1
Total		33				
IHC -	Prionics +	0				
	Prionics -	56	1	55	2	54
Total		56				

A 21 jours d'âge, les résultats des trois tests sont concordants.

A 70 jours, une seule discordance a été observée entre les résultats de l'IHC (+) et les méthodes Biorad TeSeE (+) et le Prionics CW (-). Cette discordance a été retrouvée plusieurs fois, à 100 jours et 140 jours, notamment pour des prélèvements d'amygdale. Aucun prélèvement négatif en IHC ou BioRad n'a été détecté positif par le Prionics CW.

Certains échantillons se sont révélés IHC (+) et Biorad (-) (animal 46, 100 jours, nœud lymphatique mésentérique) ou IHC (-) et Biorad (+) (animal 46 , 100 jours, rate). Il est, dans de tels cas, difficile de conclure quant aux performances relatives des deux méthodes, les fragments tissulaires testés étant différents.

b. Moelle épinière des VRQ/VRQ

Les quantités d'homogénats stocks pour le système nerveux central étaient suffisantes pour permettre de tester l'ensemble des échantillons (sauf deux) par les trois méthodes de détection de la PrPres.

En terme de précocité de détection, seuls l'IHC et le Biorad TeSeE OV ont permis de mettre en évidence de la PrPsc/PrPres dans les segments médullaires des animaux âgés de 10 mois. Ce n'est qu'à partir de 13 mois que les tests Prionics CW et BioRad TeSeE ont détecté de la PrPres dans la moelle épinière. A 13 mois, 2 des 4 prélèvements positifs en IHC, et avec les deux tests Biorad étaient négatifs en Prionics CW. La situation IHC(-), Prionics (+) BioRad (-) n'a jamais été observée. Par ailleurs, 4 échantillons positifs en IHC et TeSeE OV ont été négatifs en TeSeE.

A partir de 16 mois, si quelques discordances ont été observées (par exemple animal 104, 16 mois, segments L2 négatif en Prionics CW et positif par toutes les autres techniques) les résultats ont été très proches pour les quatre tests

Le tableau ci dessous permet la comparaison des résultats obtenus par les différents tests

			TeSeE	TeSeE-	TeSeE Ov +	TeSeE Ov -
IHC+	Prionics +	46	46	0	46	0
	Prionics -	12	2 et un douteux positif	9	10	2
Total		58				
IHC -	Prionics +	0				
	Prionics -	45	2	43	4	41
Total		45				

De même que pour le tissu lymphoïde, les discordances entre d'une part le test immunohistochimique et d'autre part les tests biochimiques sont difficiles à interpréter dans la mesure où les échantillons n'étaient pas strictement équivalents. On note toutefois dans les cas où l'IHC était positive l'existence de paires discordantes avec Prionics CW négatif et TeSeE positifs (2 échantillons plus un douteux) ainsi que Prionics CW négatif et TeSeE OV positif (10 échantillons).

6. Discussion

Cette étude a permis l'évaluation comparative de 2 techniques ELISA développées par Biorad (TeSeE et TeSeEpetits ruminants, et d'une technique de western blot développée par Prionics, pour la détection de PrPres à partir d'échantillons de tissus lymphoïdes et de moelle épinière, issus d'ovins en phase d'incubation de la tremblante.

Les mêmes échantillons tissulaires ont été analysés selon les recommandations spécifiques de chacun des tests Biorad et Prionics. En revanche, des fragments tissulaires adjacents mais forcément différents, ont été utilisés pour l'IHC d'une part et pour les tests Biorad et Prionics, d'autre part.

La sensibilité de détection de la PrPres des tests Biorad TeSeE® et surtout TeSeE®OV, s'est avérée supérieure à celle de la méthode Prionics Check Western, aussi bien à partir des échantillons de tissus lymphoïdes que de moelle épinière. Ainsi sur 33 échantillons de tissus lymphoïdes positifs en IHC, 31 (soit 94 %) étaient positifs en Biorad TeSeE et 32 (soit 97 %) en BioradTeSeEOv, contre 27 (soit 82 %) en Prionics CW. Sur 58 échantillons de tissus nerveux positifs en IHC, 48 (soit 83 %) étaient positifs en Biorad TeSeE et 56 (soit 97 %) en BioradTeSeEOv, contre 46 (soit 79 %) en Prionics CW.

En revanche, tous les échantillons lymphoïdes ou nerveux négatifs en IHC étaient également négatifs en Prionics CW. Sur les 56 échantillons lymphoïdes négatifs en IHC, 55 (soit 98 %) étaient négatifs en Biorad TeSeE et 54 (soit 96 %) en BioradTeSeEOv. Sur les 45 échantillons nerveux négatifs en IHC, 43 (soit 96 %) étaient négatifs en BioradTeSe et 41 (soit 91 %) en BioradTeSeEOv. La positivité de certains échantillons en Biorad, alors que l'IHC est négative, ne peut être attribuée avec certitude à un défaut de spécificité, compte tenu de la localisation différente des échantillons analysés par ces 2 techniques.

Lorsque l'immunohistochimie est prise comme méthode de référence, l'indice de concordance (Vrais Positifs+ Vrais Négatifs / Vrais positifs + Vrais négatifs + Faux positifs+ Faux négatifs) à partir des échantillons lymphoïdes est de 93 % pour Prionics CW, de 97% pour Biorad TeSeE et de 97 % pour Biorad TessSeE Ov. A partir des échantillons nerveux, l'indice de concordance est de 88% pour Prionics CW, de 89 % pour Biorad TeSeE et de 94 % pour Biorad TeSeE Ov.

L'interprétation des résultats doit tenir compte de différentes limites, liées principalement au matériel biologique analysé.

La première limite est la représentativité des génotypes ovins utilisés. Parmi les génotypes sensibles à la tremblante, seuls des homozygotes VRQ/VRQ ont été prélevés. Ce génotype s'il apparaît comme très sensible a cependant une fréquence réduite dans l'ensemble des races ovines françaises.

La deuxième limite est la représentativité de la « souche » de tremblante. L'ensemble des échantillons provient d'un seul troupeau, où différents isolats ont été caractérisés comme une souche de tremblante (P. Sarradin INRA-PII Tours, résultats non publiés). Dans les troupeaux ovins, le nombre et la fréquence des souches de tremblante naturelle restent mal connus. En toute rigueur les résultats obtenus ne peuvent donc être extrapolés à d'autres isolats qui diffèreraient par exemple de l'isolat Langlade par la sensibilité de la PrPres à la protéinase K.

La troisième limite est le nombre réduit d'échantillons testés.

7. Conclusions

A partir d' échantillons de tissus lymphoïdes et de moelle épinière d'ovins VRQ/VRQ issus d'un même troupeau, et prélevés à différents stades d'incubation de la tremblante, les résultats obtenus suggèrent une plus grande précocité de détection de la PrPres pour les tests Biorad TeSeE et surtout Biorad TeSeE OV, par rapport au test Prionics Check Western.

Ces résultats ont été obtenus dans des conditions d'essai destinées à mettre en évidence des différences de sensibilité analytique, en relation avec la cinétique de dissémination dans l'organisme. Ils doivent être complétés par l'évaluation des performances des tests (sensibilité, spécificité) dans les conditions de terrain.

ANNEXE 1

Préparation des homogénats stocks

- Echantillonnage des nœuds lymphatiques, de la rate et des plaques de Peyer provenant d'ovins de génotype sensible (VRQ/VRQ) et résistant (ARR/ARR, contrôle négatif).
- Elimination du tissu conjonctif et adipeux.
- Découpe d'un fragment de tissu et pesée sur balance de précision au mg près (300 mg et 700 mg).
- Ajout de 5 volumes d'eau ultrapure 18 mégohms à l'échantillon (**poids/volume**) contenu dans un tube de type Prycon à ailettes adaptées au tissu lymphoïde.
- Homogénéisation du tissu en système MediFASTH (Consul TS, Italie) pendant 45 secondes. Le nombre de cycles d'homogénéisation a été adapté aux type de tissu.
- Transfert de l'homogénat stock en plaque de 96 puits (2.2 mL de profondeur) puis congélation à - 80°C

Test Prionics

- Transfert de 250 µL de l'homogénat en microtube de 1.5 mL
- Ajout de 250 µl de Tampon d'Homogénéisation concentré 2x
- Agitation par vortex pendant 3 secondes
- Ajout de 50 µL de Tampon de Digestion.
- Ajout de 50 µl de protéinase K et agitation par refoulement.
- Incubation 40 min à 48°C en incubateur sec pour microtube
- Arrêt de la digestion par ajout de 50 µL de Tampon Digestion Stop. Agitation par refoulement.
- Centrifugation 15 000 g 30 minutes à RT°C
- Elimination du surnageant par retournement du tube et séchage sur papier absorbant.
- Reconstitution du culot par 20 µl de Tampon d'Homogénéisation
- Transfert de la solution en plaque 96 puits
- Ajout de 15 µl de Tampon Echantillon et dénaturation 5 min à 96°C.
- Transfert des protéines sur membrane PVDF (150 V, 1 heure, 5°C).
- Incubation de 45 minutes en Tampon de Blocage à RT°C
- 1 heure d'incubation avec l'anticorps primaire (6H4) dilué au 1 : 5000 en TBS-Tween 20.
- Lavages
- Incubation avec l'anticorps secondaire dilué au 1 :5000 pendant 30 minutes.
- Révélation par chemiluminescence. La durée d'exposition du film, réalisée en chambre noire, a été optimisée par rapport à l'intensité du profil du contrôle positif jusqu'à obtention de trois bandes épaisses intensément.

Test Biorad

- Transfert de 700 µL en plaque 96 puits
- Répartition de 250 µL d'homogénat 10% dans une nouvelle plaque 96 puits par le système automatisé
- Ajout de 250 µL de tampon A ou A', selon la méthode (TeSeE ou TeSeE OV), additionné de protéinase K diluée (2 µL de PK pour 1 mL de tampon A ou A')
- Mélange par refoulement et incubation en bloc chauffant à 37°C 10 min.
- Ajout de 250 µL de réactif B. Homogénéisation par refoulement.
- Centrifugation pendant 5 min à 20.000 g à 20°C
- Elimination du surnageant et séchage des tubes sur papier absorbant par retournement pendant 5 min.
- Ajout de 25 µL de réactif C.
- Incubation 5 min à 100°C.
- Dilution dans 125 µL de réactif R6
- Préparation du contrôle positif R4
- Dépôt dans les puits A1-B1-C1-D1 de 100 µL de contrôle négatif R3
- Dépôt dans les puits E1-F1 de 100 µL de contrôle positif R4/
- Dépôt dans les autres puits de 100 µL des échantillons dilués en réactif R6
- Incubation pendant 75 min à 37°C
- Lavages (3 cycles) par laveur PW40 sur programme (TSE3)
- Ajout de 100 µL de solution de conjugué dilué au 1 :10 en tamponde lavage 1x (variable selon la méthode TeSeE utilisée)
- Incubation 60 min à 4°C
- Préparation de la solution de révélation enzymatique (dilution au 1 :11^{ème} de R8+R9)
- Lavages (5 cycles) par laveur PW40 sur programme (TSE5)
- Ajout de 100 µL de solution de révélation
- Incubation 30 min à l'obscurité à température ambiante
- Ajout de 100 µL de solution d'arrêt
- Lecture des densités optiques en bichromatisme à 450 nm- 620 nm.

Comparaison des tests immunohistochimique, Prionics Check Western et Biorad TeSeE bovin et TeSe E ovin pour la détection de la PrPSc/PrPres dans des tissus lymphoïdes d'ovins à différents stades d'incubation de la tremblante.

		10 jours				21 jours				70 jours				100 jours				140 jours			
		IHC	Pri	Tese	Tese ov	IHC	Pri	Tese	Tese ov	IHC	Pri	Tese	Tese ov	IHC	Pri	Tese	Tese ov	IHC	Pri	Tese	Tese ov
VRQ/VRQ	PP ii	-	-	-	-	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+
	MLN	-	ND	ND	28	MLN	-	-	-	MLN	+	+	ND	46	MLN	+	+	MLN	+	+	+
	SPL	-	-	-	-	SPL	-	-	-	SPL	-	-	-	46	SPL	+	+	SPL	+	+	+
	Tons	-	ND	ND	ND	Tons	-	ND	ND	Tons	+	ND	ND	46	Tons	+	+	Tons	+	+	+
	PLN	-	-	-	-	PLN	-	-	-	PLN	-	-	-	46	PLN	+	+	PLN	+	+	+
	IHC	Pri	Tese	Tese	ov	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese
	PP ii	-	-	-	-	PP ii	-	-	-	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+
	MLN	-	-	-	-	MLN	-	-	-	MLN	+	+	ND	38	MLN	+	+	MLN	+	+	+
	SPL	-	-	-	-	SPL	-	-	-	SPL	-	-	-	38	SPL	+	+	SPL	+	+	+
	Tons	-	ND	ND	ND	Tons	-	ND	ND	Tons	+	ND	ND	38	Tons	+	+	Tons	+	+	+
	PLN	-	ND	ND	ND	PLN	-	ND	-	PLN	-	-	-	38	PLN	-	-	PLN	-	-	-
ARR/	IHC	Pri	Tese	Tese	ov	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese
	PP ii	-	-	-	-	PP ii	-	-	-	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+
	MLN	-	ND	ND	31	MLN	-	-	-	MLN	+	+	ND	39	MLN	+	+	MLN	+	+	+
	SPL	-	-	-	-	SPL	-	-	-	SPL	-	-	-	39	SPL	+	+	SPL	+	+	+
	Tons	-	ND	ND	ND	Tons	-	ND	ND	Tons	+	ND	ND	39	Tons	+	+	Tons	+	+	+
	PLN	-	ND	ND	ND	PLN	-	-	-	PLN	-	-	-	39	PLN	-	-	PLN	-	-	-
	IHC	Pri	Tese	Tese	ov	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese
	PP ii	-	-	-	-	PP ii	-	-	-	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+	PP ii	+	+	+
	MLN	-	ND	ND	31	MLN	-	-	-	MLN	+	+	ND	42	MLN	+	+	MLN	+	+	+
	SPL	-	-	-	-	SPL	-	-	-	SPL	-	-	-	42	SPL	+	+	SPL	+	+	+
	Tons	-	ND	ND	ND	Tons	-	ND	ND	Tons	+	ND	ND	42	Tons	+	+	Tons	+	+	+
	PLN	-	ND	ND	ND	PLN	-	-	-	PLN	-	-	-	42	PLN	+	-	PLN	+	-	-
ARR/	IHC	Pri	Tese	Tese	ov	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese
	PP ii	-	-	-	-	PP ii	-	-	-	PP ii	-	-	-	PP ii	-	-	-	PP ii	-	-	-
	MLN	-	-	-	-	MLN	-	-	-	MLN	-	-	-	43	MLN	-	-	MLN	-	-	-
	SPL	-	-	-	-	SPL	-	-	-	SPL	-	-	-	43	SPL	-	-	SPL	-	-	-
ARR/	Tons	-	ND	ND	-	Tons	-	ND	ND	Tons	-	ND	ND	43	Tons	-	-	Tons	-	-	-
	PLN	-	-	-	-	PLN	-	-	-	PLN	-	-	-	43	PLN	-	-	PLN	-	-	-
	IHC	Pri	Tese	Tese	ov	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese	IHC	Pri	Tese	Tese

Comparaison des tests immunohistochimique, Prionics Check Western et Biorad (TeSE-E bovin et TeSE-E ovin) pour la détection de la PPSP/PRPres dans des segments de moelle épinière d'ovins à différents stades d'incubation de la tremblante

VRQ/VRQ	10 mois				13 mois				16 mois				19 mois				23 mois			
	IHC	Pri	Tese	Tese ov	IHC	Pri	Tese	Tese ov	IHC	Pri	Tese	Tese ov	IHC	Pri	Tese	Tese ov	IHC	Pri	Tese	Tese ov
	C4	-	-	-	C5	-	-	-	C6	-	-	-	C5	+	+	+	C6	+	+	+
95	C5	-	-	-	C6	-	-	-	C7	-	-	-	C6	+	+	+	C7	+	+	+
	TH8	-	-	-	99	TH8	+	-	104	TH8	+	+	111	TH8	+	+	116	TH8	+	+
	TH9	-	-	-	TH9	+	-	D	TH9	+	+	TH9	+	+	+	TH9	+	+	+	
	L1	-	-	-	L1	-	-	+ +	L1	+	+	L1	+	+	+	L1	+	+	+	
	L2	+	-	-	L2	-	-	+ +	L2	+	-	L3	+	+	+	L2	+	+	+	
96	C5	-	-	-	C6	-	-	-	C5	-	-	-	C5	+	+	+	C6	+	+	+
	C6	-	-	-	100	C7	-	-	C6	-	-	-	C6	+	+	+	C7	+	+	+
	TH8	-	-	-	TH8	+	+	+	107	TH8	ND	+	113	TH7	+	+	119	TH13	+	+
	TH9	-	-	-	TH9	+	+	+	TH9	+	+	+	TH8	+	+	+	L1	+	+	+
	L1	-	-	-	L2	+	-	-	L1	+	+	+	L2	+	+	+	L2	+	+	+
	L2	-	-	D	L3	-	-	-	L2	+	+	+	L3	+	+	+				
97	C5	-	-	-	C6	-	-	-	C5	-	-	-	C5	+	+	+	C6	+	+	+
	C6	-	-	-	101	TH8	+	-	C6	-	-	-	C6	+	+	+	117	TH7	+	+
	TH8	+	-	-	TH9	+	-	-	110	TH9	+	+	112	TH8	+	+	114	TH7	+	+
	TH9	+	-	-	L1	+	-	-	TH10	+	+	+	TH9	+	+	+	TH8	+	+	+
	L1	+	-	-	L2	+	-	-	L1	+	+	+	L1	+	+	+	L1	+	+	+
	L2	+	-	D	L3	-	-	-	L2	+	-	D	L2	+	+	L2	+	+	+	
ARR/	C5	-	-	-	C6	-	-	-	C5	-	-	-	C5	+	+	+	C6	-	-	-
	C6	-	-	-	TH8	+	-	-	C6	-	-	-	102	TH7	-	-	114	TH7	-	-
	TH9	-	-	-	L1	+	-	-	TH9	+	+	+	TH8	-	-	?	L1	-	-	-
	L1	+	-	-	L2	+	-	-	L1	+	+	+	L1	+	+	+	L2	-	-	-
	L2	+	-	D	L3	-	-	-	L2	+	-	D	L2	+	+	L2	-	-	-	

Annexe 2

Note sur les travaux réalisés à l'AFSSA-Lyon sur les discordances des tests rapides de diagnostic de la tremblante chez les petits ruminants

Note sur les travaux réalisés à l'AFSSA-Lyon sur les discordances des tests rapides de diagnostic de la tremblante chez les petits ruminants.

T. BARON, A.-G. BIACABE, J.-Y. MADEC

24 avril 2003

Les données obtenues dans le cadre du programme de dépistage actif de la tremblante des petits ruminants initié au cours de l'année 2002 ont permis d'identifier 21 échantillons (20 moutons et une chèvre) présentant des discordances entre différents tests de diagnostic, 19 ayant été identifiés initialement par le test Platelia-Biorad et 2 par le test Prionics-Check.

Ces échantillons ont initialement été particularisés par l'absence de détection de la protéine prion anormale par Western blot après ultra-centrifugation, avec plusieurs anticorps différents. En revanche ces échantillons ont tous montré un immunomarquage spécifique de la protéine prion anormale par une technique d'immunohistochimie. Parmi 196 échantillons examinés (171 ovins et 15 chèvres), tous les autres échantillons (165) ont été confirmés en Western blot, incluant l'ensemble des 99 échantillons initialement trouvés positifs par le test Prionics.

Une étude de ces échantillons a été conduite (Annexe), permettant la comparaison sur un même homogénat de tronc cérébral des tests Platelia-Biorad et Prionics-Check.

Les 19 échantillons initialement trouvés positifs par le test Platelia-Biorad (18 moutons et une chèvre), sont trouvés de façon répétée positifs par ce test et négatifs par le test Prionics. Ces discordances sont retrouvées de la même manière lors de l'examen d'un même homogénat de tissu cérébral par les deux tests, Biorad et Prionics. Le niveau de positivité par le test Biorad de ces échantillons est souvent élevé, dans 10 cas sur 17 supérieur à 10 fois le seuil de positivité du test Biorad lors des analyses réalisées sur un même homogénat par les test Biorad et Prionics.

Les 2 échantillons trouvés initialement positifs par le test Prionics-Check (2 moutons), sont en revanche trouvés négatifs par les deux tests, Prionics-Check et Platelia-Biorad, à partir d'homogénats réalisés à partir de l'échantillon restant. Ces résultats suggèrent que dans ces deux cas les discordances observées peuvent être liées aux variations de distribution de la protéine prion anormale dans le tronc cérébral.

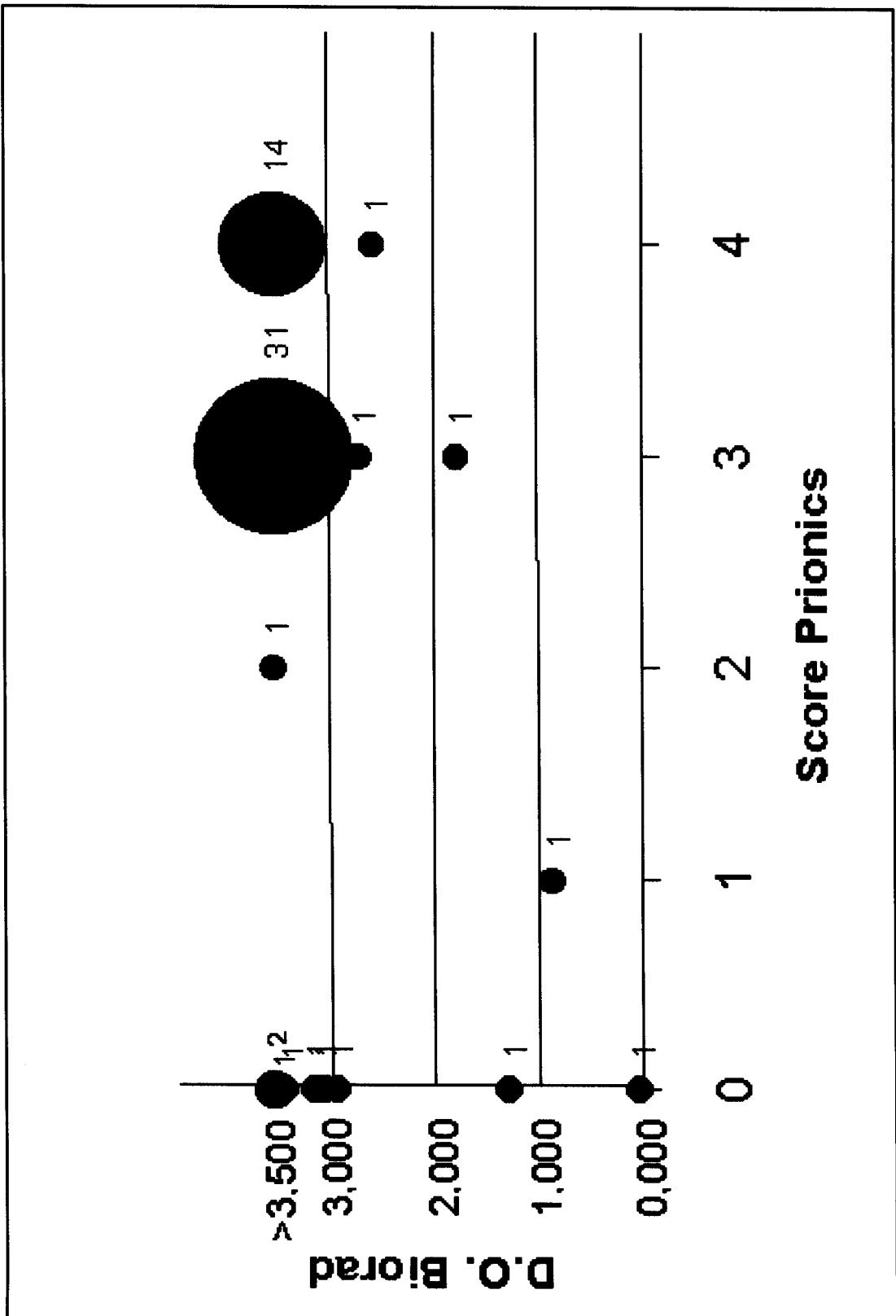
Les expériences de comparaison des tests Prionics-Check et Platelia-Biorad ont par ailleurs été réalisées sur une série de 41 échantillons ovins trouvés initialement positifs par le test Biorad et confirmés positifs par Western blot après ultra-centrifugation. Cette série représente l'ensemble des échantillons ovins trouvés initialement positifs par le test Biorad et disponibles au moment de cette étude. L'analyse d'un même homogénat par les tests Prionics-Check et Platelia-Biorad a conduit à des résultats positifs pour les 2 tests dans l'ensemble des échantillons examinés. Il existe une bonne corrélation pour ces échantillons entre les signaux spécifiques de la protéine prion anormale identifiées par le test Prionics (mesuré par un score en fonction du nombre de bandes identifiées et de leur intensité) et par le test Biorad (densité optique). De même aucune discordance entre les test Prionics-Check et Platelia Biorad n'a été observée à partir de l'analyse d'un même homogénat préparé à partir de 10 échantillons caprins confirmés par Western blot.

Conclusion :

Les travaux réalisés permettent d'identifier une sous-population d'isolats de tremblante positifs par le test Platelia Biorad et négatif par Western blot après ultracentrifugation ainsi que par le test Prionics.

L'origine de ces discordances reste actuellement indéterminée et nécessite des travaux complémentaires.

**Corrélations entre l'intensité du signal du WB Prionics
et la D.O. du test Biorad
sur les Ovins/Caprins du Sondage DGAL 2002**



Corrélations entre l'intensité du signal du WB Prionics et la D.O. du test Biorad sur les Ovins/Caprins du Sondage DGAL 2002

- Nombre de prélèvements présentés dans le graphique Page1 :

TEST		
	Prionics	Biorad
Nombre d'échantillons positifs	51	60
Nombre d'échantillons négatifs	10	1
Total	61	61

- Score Prionics : l'intensité du profil visualisé sur le film photographique en un chiffre compris entre 0 et 4 : 0 négatif, 1 à 4 positif

Comparaison des tests Biorad et Prionics sur un même homogénat

Programme	Espèce	Génotype	Même homogénat		IHC
			Ratio(D.O./seuil)	Prionics	
TREM AB 2002	Ovin	ARQ/ARQ	12,32	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARR/ARR	14,70	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARR/ARRQ	12,89	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARR/ARRQ	NA	>14,83	Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARR/ARRQ	4,02	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARQ/ARQ	>14,83	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARR/ARRQ	13,06	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	NA	2,06	Négatif	Positif
TREM EQ 2002	Caprin	██████████	14,44	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARQ/ARRQ	3,57	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	NA	NR(Q)		Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARQ/ARRQ	5,41	Négatif	Positif
TREM EQ 2002	Ovin	ARQ/ARRQ	13,29	Négatif	Positif
TREM EQ 2002	Ovin	**	5,31	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	**	9,23	Négatif	Positif
TREM AB 2003	Ovin	**	10,71	Négatif	Positif
TREM EQ 2003	Ovin	**	8,88	Négatif	Positif
TREM EQ 2003	Ovin	**	12,52	Négatif	Positif
TREM AB 2002	Ovin	ARR/ARRQ	NR		Positif
TREM AB 2002	Ovin	**	0,08	Négatif	Positif

NA Non Analyssable avec la première extraction d'ADN (réanalyse en cours chez LABOGENA)

NR Non Réalisé (Quantité insuffisante)

** En cours chez LABOGENA