
Dispositif analytique IBR:

Test gE – Analyse de mélange – Bovin atypique



Stephen VALAS

Avec le soutien
financier de  RÉGION
Nouvelle-
Aquitaine

Journée de la référence professionnelle – Maisons-Alfort, 23 novembre 2017

❑ Production de matériaux de référence

2017: 286 demandes, 1209 unités

2016: 336 demandes, 1236 unités

❑ Contrôle de réactifs

2017:

- 6 contrôles en initial (gE)
- 45 contrôles de lot

2016:

- 6 contrôles en initial (gE)
- 32 contrôles de lot

❑ Echantillothèque:

2016-17: bovins vaccinés Δ gE

2015-16: bovins indemnes/infectés

❑ **EILA** (biannuel): aucun en 2017

❑ **Diagnostic de confirmation**: transfert des analyses de confirmation gE aux LDAs

2016: 1581 demandes

2017: 21 demandes

❑ Expertise et R&D

Bovins atypiques gB+/gE-

Programmation 2017

2016

Révision des seuils

Critères d'homogénéité inter-lots

Validation hors vaccination

Analyse de mélange

Ac ttx

Analyse individuelle

gB

gE

2017

Critère d'homogénéité inter-lots

Validation vaccination Δ gE

Critère d'homogénéité inter-lots

Contrôle de réactifs (11/2016 - 11/2017)

- 6 contrôles en initial (gE)
- 45 contrôles de lot

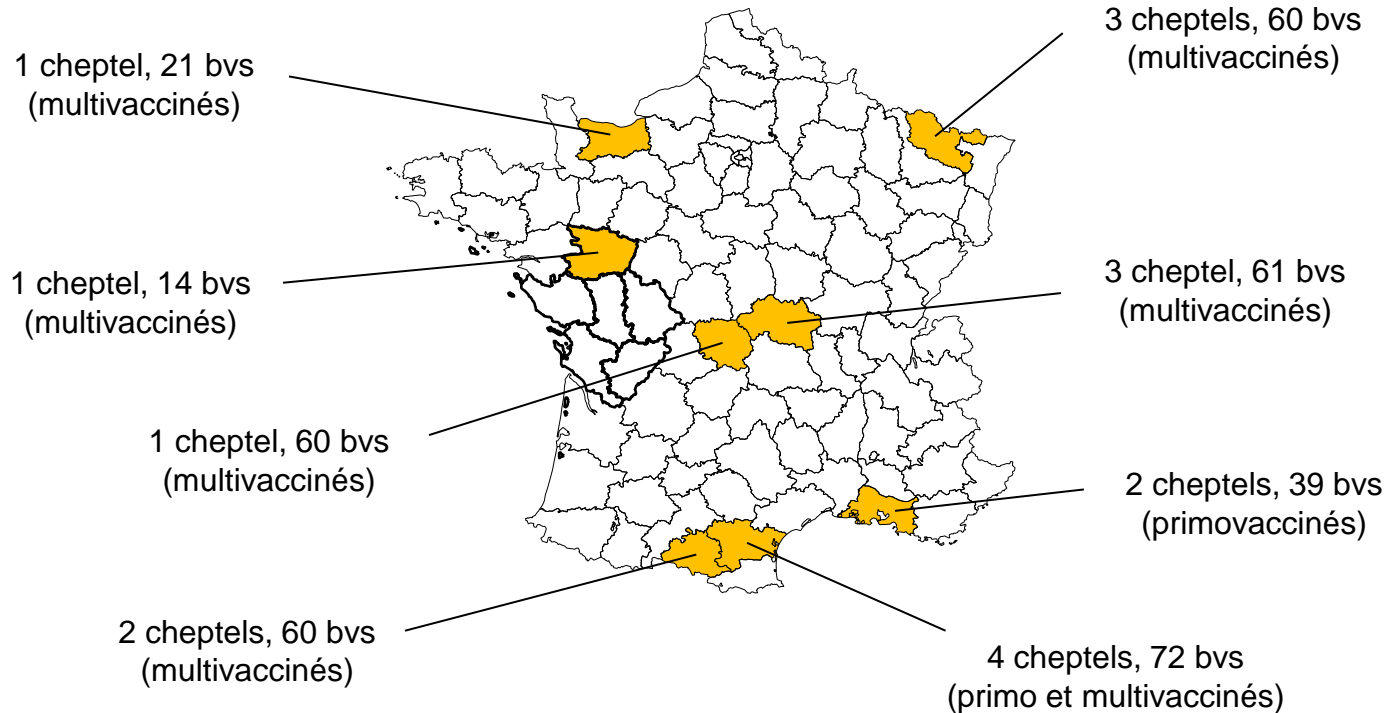
Matrice	ELISA	Kit	Contrôle	Conforme	Non conforme
Lait et sérum de mélange	Ac ttx	Idexx Idvet	17 lots	14	3
	Ac ttx	Idexx Idvet	18 lots	13	5
Sérum individuel	gB	Idexx Idvet Biosellal	6 lots	5	1
	gE	Idexx Idvet Biosellal	6 kits et 4 lots		
				78%	22%

Chronologie d'intégration des tests ELISA gE dans le dispositif analytique IBR

- ❑ **Août/sept. 2016:** contrôle initial de conformité des tests gE pour une application **hors vaccination**
3 fournisseurs: IDexx, IDVet, Biosellal
- ❑ **Oct./nov. 2016:** recours possible à une sous-traitance auprès du LNR-IBR
- ❑ **1^{er} déc. 2016:** réalisation des analyses gE par les laboratoires départementaux
- ❑ **Mars 2016 à Juillet 2017:** constitution d'une échantillothèque sérum/lait de bovins vaccinés Δ gE et définition des panels de référence
- ❑ **Juin/oct. 2017:** contrôle initial de conformité des tests gE pour une application **en contexte de vaccination Δ gE**

Échantillothèque bovins vaccinés ΔgE

- ❑ Collecte de 03/2016 à 07/2017 (16 mois)
- ❑ 8 départements (03, 09, 11, 13, 14, 23, 49, 57)
- ❑ 17 cheptels
- ❑ 387 sérums, 94 laits individuels
- ❑ Primovaccinés (n=79) et multivaccinés (n=308)



Contrôle initial de conformité des tests ELISA IBR gE

- ❑ Examen du dossier administratif-technique du producteur de réactif
- ❑ Evaluation des performances du test

Paramètres	Matériels biologiques	Critères de conformité
Sensibilité analytique	<ul style="list-style-type: none"> • Sérum européen EU1 testé en double sur 2 séries • Sérum étalon français SRF2 testé en 10 répétitions sur 2 séries • 12 sérums de référence « vaccinés ΔgE et infectés » 	100% positif 100% non négatif 100% non négatif
Spécificité analytique	Sérum européen EU3 testé en double sur 2 séries	100% négatif
DéTECTABILITÉ (cohérence loi dose-effet)	2 séries de 10 dilutions (raison 2) couvrant la zone de linéarité	évolution de la positivité vers la négativité
Spécificité diagnostique	<ul style="list-style-type: none"> • 640 sérums de bovins non vaccinés • 260 sérums de bovins vaccinés ΔgE 	100% négatif ≥ 99,3% négatif
Sensibilité diagnostique	<ul style="list-style-type: none"> • 150 sérums de bovins infectés • 45 sérums de bovins vaccinés ΔgE et infectés 	≥ 98% non négatif 100% non négatif
Répétabilité intra-essai	2 séries de 80 répétitions d'un échantillon faiblement positif	CV ≤ 10%

12 sérums de référence « vaccinés ΔgE et infectés » :

- 6 sérums de bovins vaccinés puis expérimentalement infectés: FLI et Coda-Cerva
- 6 sérums échantillothèques Anses Niort/GDS France: sérums de bovins infectés dilués dans un pool de sérums de bovins vaccinés ΔgE

Contrôle de lot des tests ELISA IBR gE

Paramètres	Matériels biologiques	Critères de conformité
Sensibilité analytique	<ul style="list-style-type: none">• Sérum étalon français SRF2• 1 sérum de référence « vacciné ΔgE et infecté »	100% non négatif 100% non négatif
Délectabilité (cohérence loi dose-effet)	Dilutions sériées (raison 2) couvrant la zone de linéarité	évolution de la positivité vers la négativité
Spécificité diagnostique	<ul style="list-style-type: none">• 5 sérums de bovins non vaccinés• 5 sérums de bovins vaccinés ΔgE	100% négatif
Sensibilité diagnostique	<ul style="list-style-type: none">• 5 sérums de bovins infectés• 5 sérums de bovins vaccinés ΔgE et infectés	100% non négatif
Répétabilité intra-essai	2 séries de 40 répétitions d'un échantillon faiblement positif	CV \leq 10%
Homogénéité inter-lots	3 dilutions de 5 sérums de référence « vaccinés Δ gE et infectés »: <ul style="list-style-type: none">- Positif- Douteux ou au seuil- Négatif	évolution de la positivité vers la négativité

Bilan du contrôle de conformité des tests ELISA IBR gE au 23/11/2017

❑ 6 contrôles de type initial

❑ 4 contrôles de lot

Producteur	Kit	Type de contrôle	Conformité hors vaccination	Conformité en contexte de vaccination	Paramètre non conforme
A	Kit 1	initial	✓	(✓)	
	Kit 1 - Lot 1	lot	✓	✗	sensibilité
	Kit 2	initial	✓	✓	
	Kit 2 - Lot 1	lot	✗	✗	Défauts multiples
B	Kit 1	initial	✗	Non évalué	spécificité
	Kit 2	initial	✓	✓	
	Kit 2 - Lot 1	lot	✓	✓	
	Kit 2 - Lot 2	lot	✓	✓	
C	Kit 1	initial	✓	✗	sensibilité
	Kit 2	initial	✓	✗	sensibilité

Programmation 2017

2016

Révision des seuils

Critères d'homogénéité inter-lots

Validation hors vaccination

Analyse de mélange

Ac ttx

Analyse individuelle

gB

gE

2017

Critère d'homogénéité inter-lots

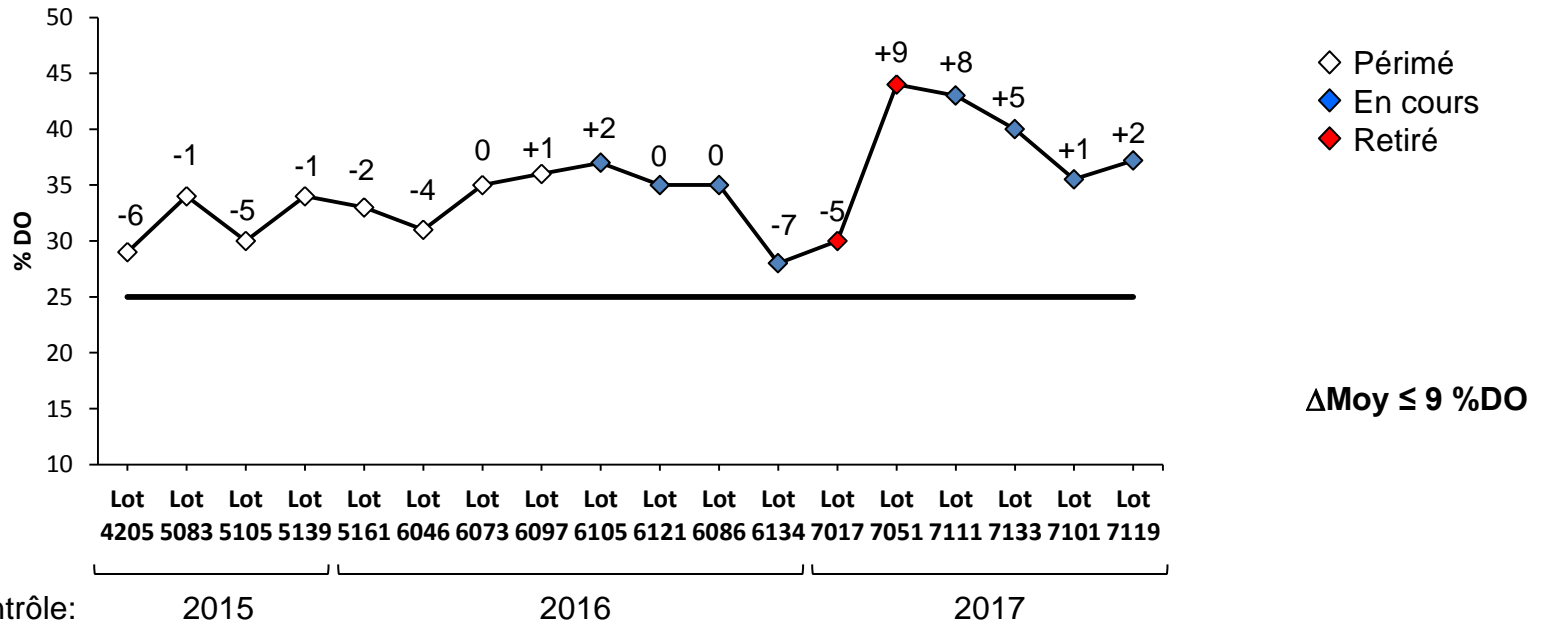
Validation vaccination Δ gE

Critère d'homogénéité inter-lots

Homogénéité inter-lots – Lait de mélange

Réactivité moyenne du lait de référence LFI 1/10

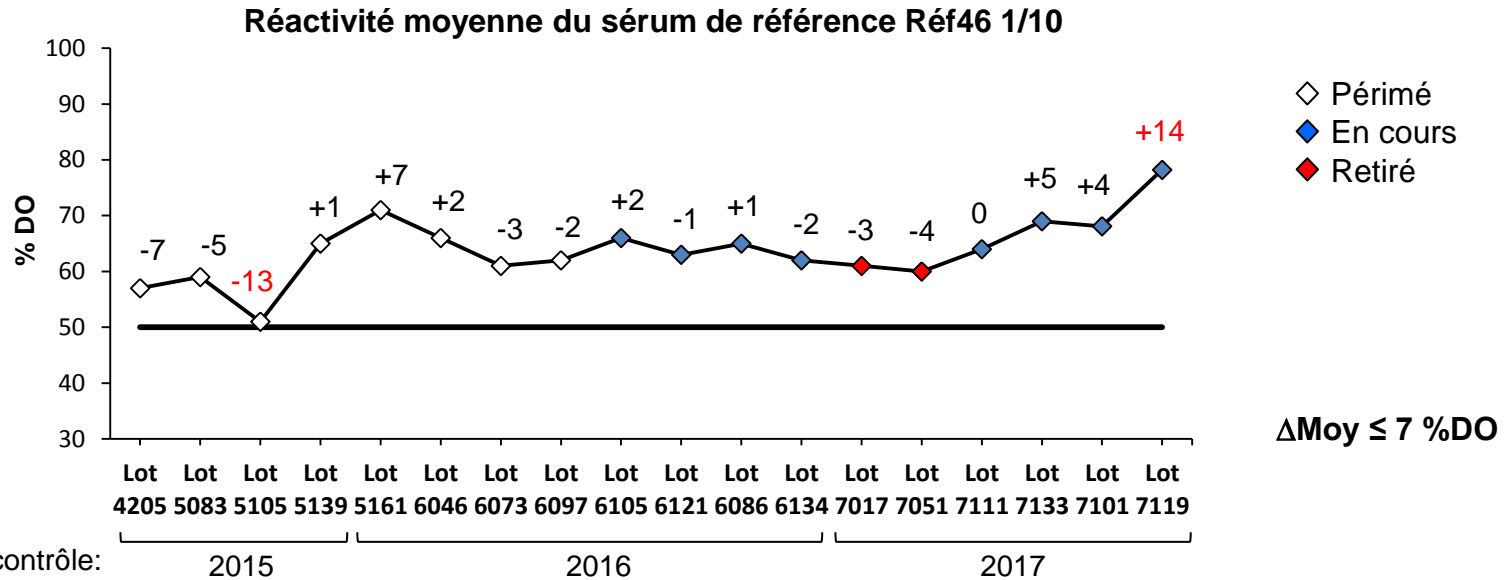
Idexx IBR Pool



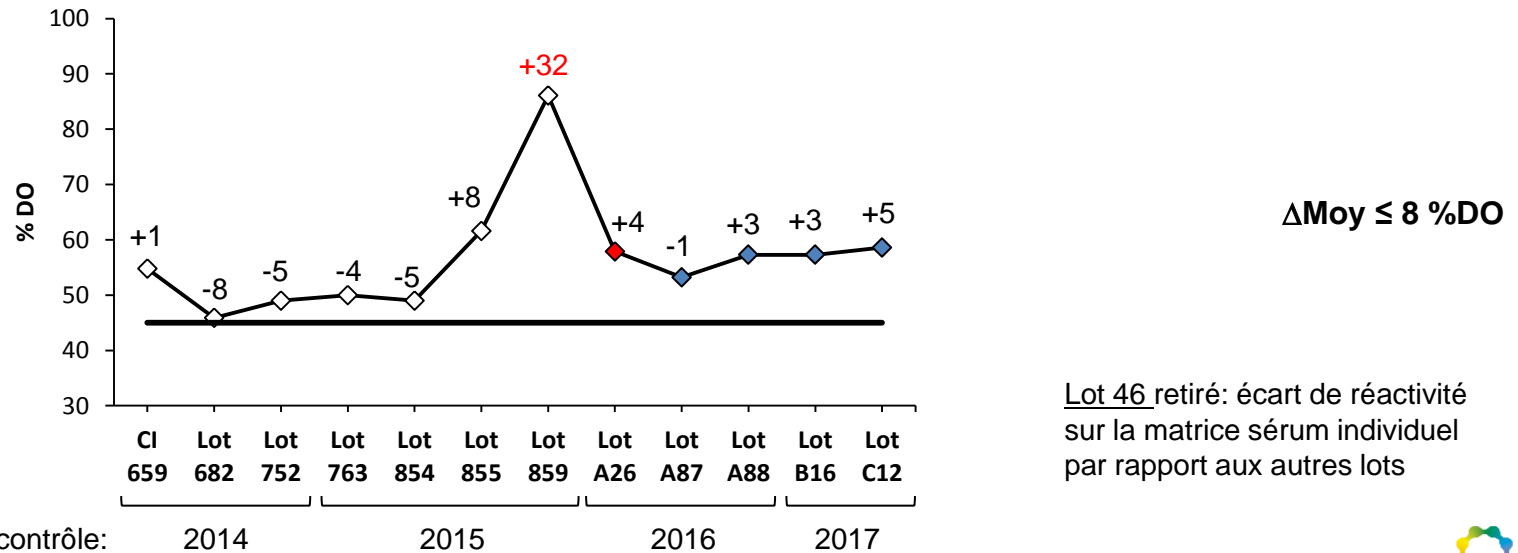
Lots 7017 et 7051 retirés du marché: turbidité (évolutive) des témoins du kit générant une réactivité anormalement élevée

Homogénéité inter-lots – Sérum de mélange

Idexx IBR Pool



ID Screen IBR Mixte Indirect



Homogénéité inter-lots – Analyses de mélange

Matrice	Kit	Ecart de réactivité échantillon de référence
Lait de mélange	Idexx	$\leq 9 \%DO$
Sérum de mélange	Idexx	$\leq 7 \%DO$
Sérum de mélange	Idvet	$\leq 8 \%DO$

Communiqué LNR-IBR 27/07/2017: intégration d'un critère « Homogénéité inter-lots » dans le contrôle de conformité des ELISA IBR Ac ttx à compter du 1^{er} Oct. 2017.

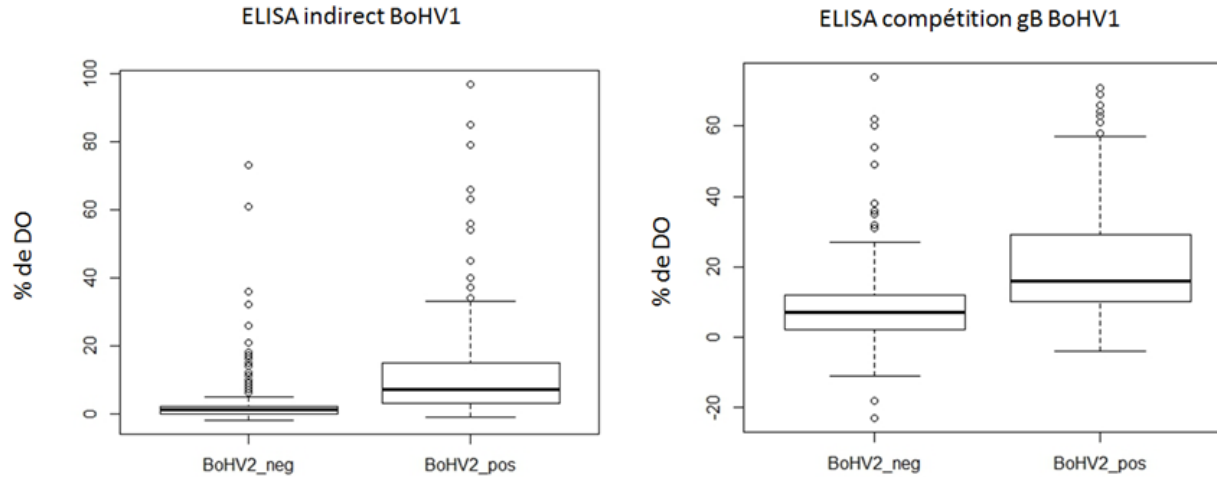
$\leq 9 \%DO$

- ❑ Bovins atypiques gB+/gE- isolés
- ❑ Cas particuliers 2017: gB+/gE- non isolés

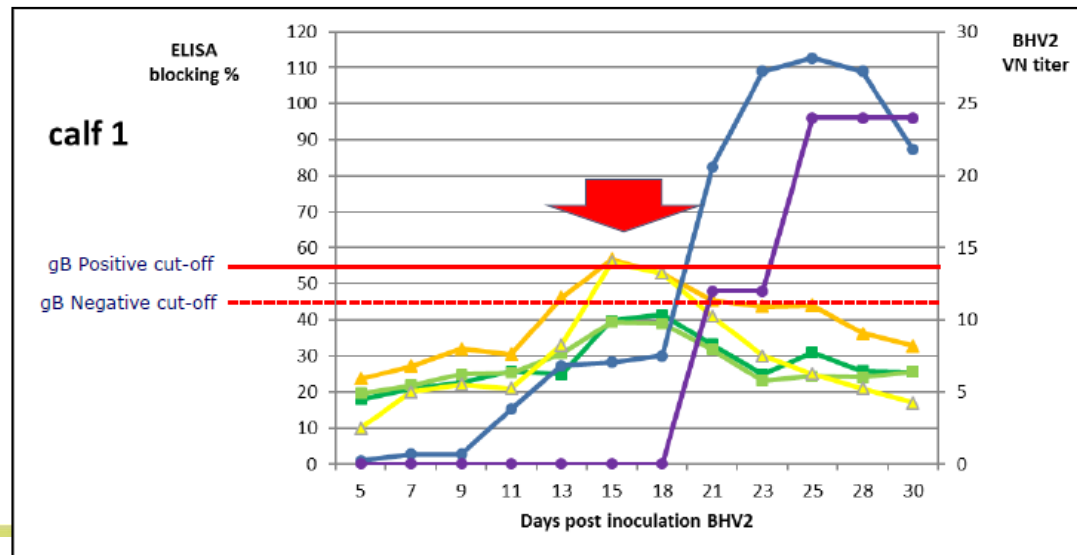
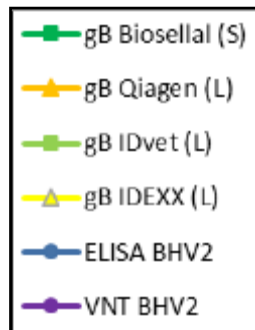
Interférence de l'infection à BoHV2 sur le diagnostic sérologique de l'IBR

□ **Böttcher J. et al., 2012:** Epidemiologically non-feasible singleton reactors at the final stage of BoHV1 eradication: Serological evidence of BoHV2 cross-reactivity.

□ **LNR-IBR**



□ **Hanon J-B. et al., Coda Cerva**



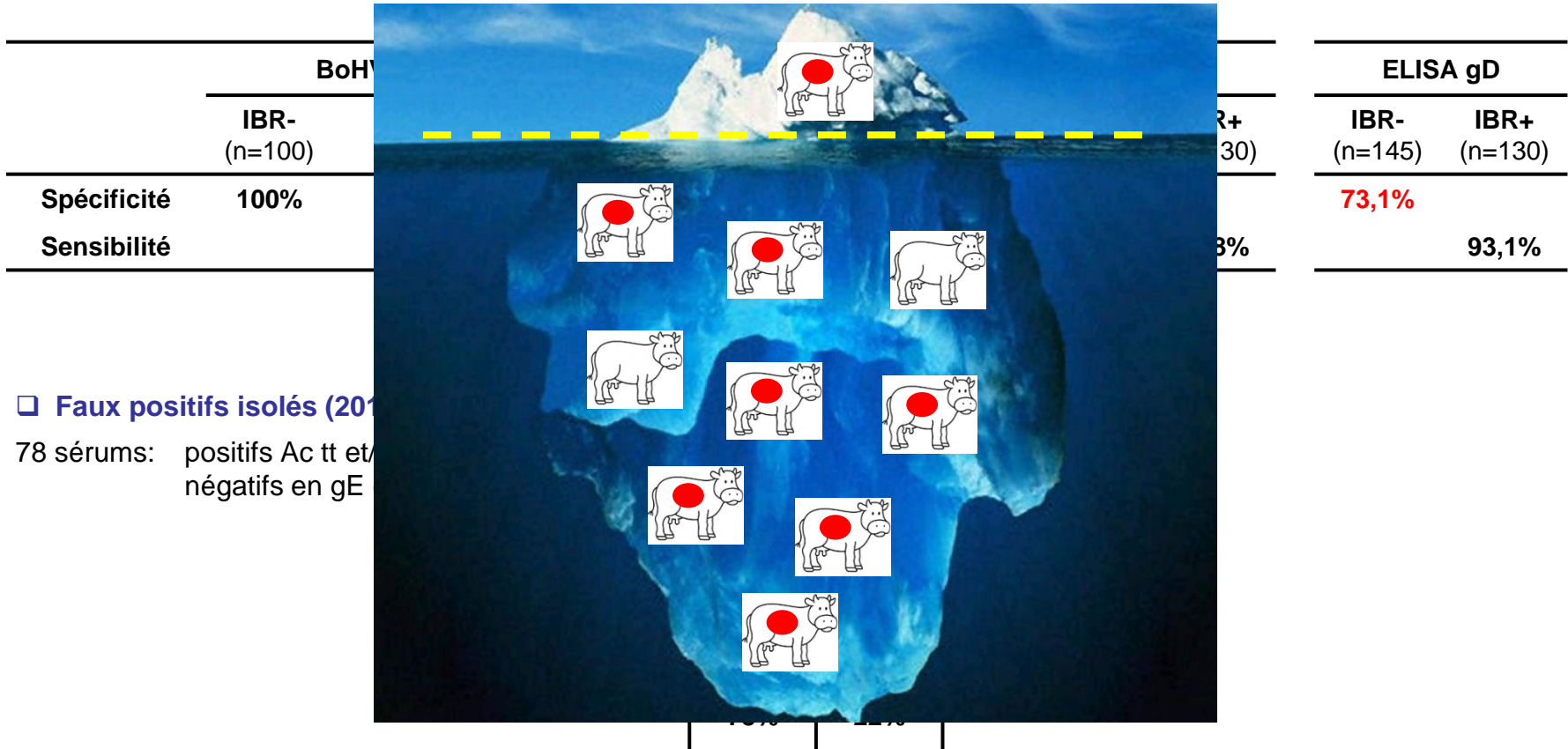
Développement de tests ELISA virus-spécifique

□ BoHV2: ELISA indirect gD

- Séquençage du génome total de BoHV2
- Développement d'un antigène recombinant gD
- Panels de sérums sélectionnés / ELISA Ac ttx BoHV2

□ BoHV1: ELISA indirect gE et gD

- Développement d'antigènes recombinants gE et gD



□ Faux positifs isolés (201)

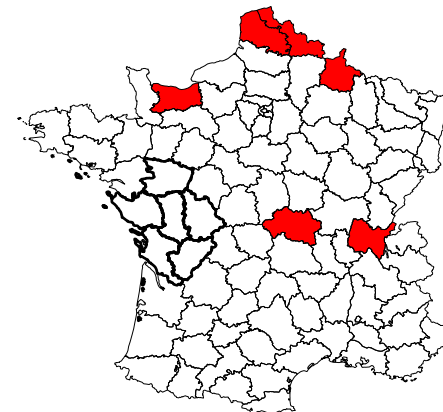
78 sérums: positifs Ac tt et négatifs en gE

⇒ Faux positifs isolés observés pour la majorité dans des élevages infectés par BoHV2

Cas particuliers reportés en 2017

6 Dpt	8 Cheptels	Jan.	Fev.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.	Aout	Sept.	Oct.	Nov.
62	Laitier (60 bvs)				Rappel BVD Tank +	Tank +	27% gB+/gE-			Coll. 10 bvs		
59	Laitier (250 bvs)	Rappel BVD			Tank +	Tank +		60% gB+/gE-		Coll. 10 bvs		
08	Allaitant (46 bvs)	Vacc. FCO	48% gB+/gE-	Collecte						Coll. 8 bvs		
01	Laitier (55 bvs)	Rappel BVD	Vacc. FCO	Rappel FCO	45% gB+/gE-	Collecte				Coll. 26 bvs		
03	Allaitant			Vacc. FCO (vente)				gB+/gE-		Suivi 7 bvs		
14	Laitier		Vacc. FCO Lot de 12 bvs, concours	Rappel FCO			12 bvs gB+/gE-					Suivi 12 bvs
	Laitier		Vacc. FCO 1 bv, concours	Rappel FCO gB+/gE-							Suivi 1 bv	
	Laitier		Vacc. FCO 2 bvs, concours	Rappel FCO gB+/gE-							Suivi 2 bvs	

- Vacc. FCO: Bluevac BTV8 (vaccin inactivé, Espagne)
- Vacc. BVD: Bovela (vaccin vivant modifié, Boehringer)
- Tests PCR (IBR, BoHV2 et Pan-Herpèsvirus) négatifs sur 2 lots vaccin FCO
- Autres cheptels vaccinés et sans positivité IBR



Bilan analytique

5 à 8 mois après la découverte des positivité IBR:

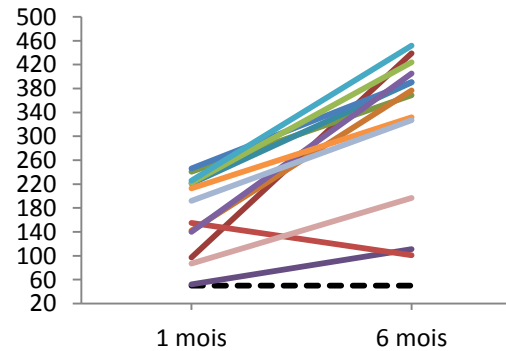
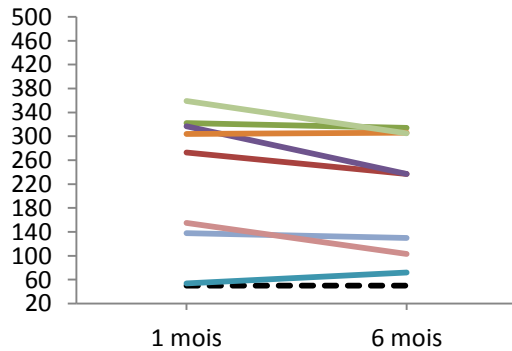
- 100% cheptels négatifs en ELISA IBR gE
- 7/8 cheptels négatifs en BoHV2

Vaccination unique

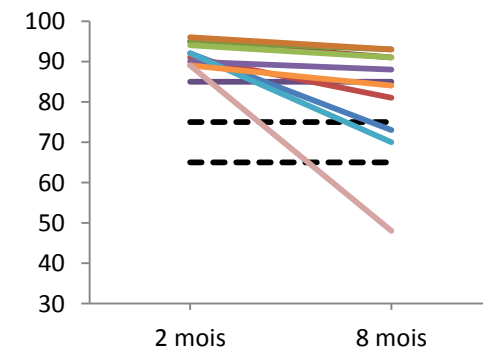
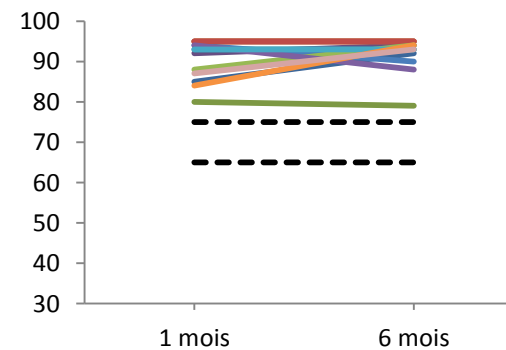
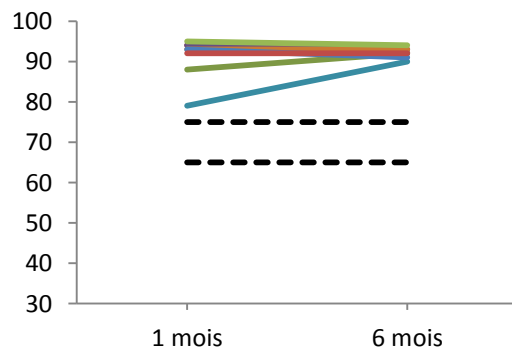
Vaccination double

Vaccination unique

Ac ttx



gB



□ Evaluation des performances des analyses de mélange (lait et sérum)

➤ Lait:

- Législation EU: lait de tank ≤ 50 vaches
- Littérature: seuil de détectabilité: prévalence intra-cheptel $\geq 10\%$
- LNR-IBR: 70 laits individuels positifs et 390 laits individuels négatifs
 - approche expérimentale: reconstitution de lait de mélange
 - renouvellement des panels du contrôle de réactif: nouveau contrôle initial du test en cours de commercialisation (Idexx pool)

➤ Sérums de mélange:

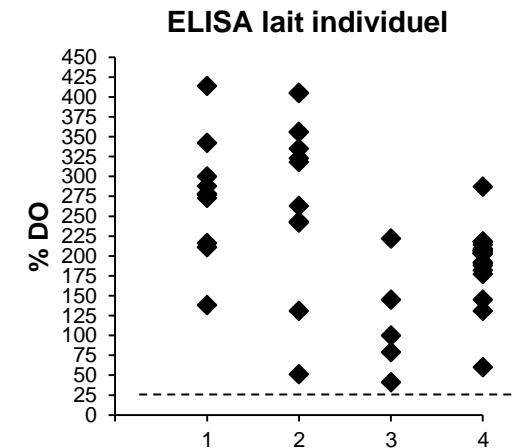
- Évaluation des performances à grande échelle: LDAs pilotes
 - Spécificité: nombre de mélanges « faux positifs »
Contrainte: pas de requête dans SIGAL permettant d'établir un lien direct entre 1 mélange positif et les résultats gB des sérums constitutifs.
 - Sensibilité: nombre de mélanges « faux négatifs »
Contrainte: différents contextes à considérer (positifs isolés, séroconversion massive, assainissement)

□ EILA

- Avril-juin
- gB (sérum) et Ac ttx (lait)
- Logiciel LEILA: inscription, suivi, résultats et rapports

□ Appui scientifique et technique

- Suivi longitudinal des bovins atypiques en lien avec les vaccinations



Merci de votre attention

