

Exploitation du Test Buvard Whatman 3MM pour le diagnostic de la peste porcine Africaine (PPA) à Madagascar

T.Randriamparany¹, F. Ravaomanana¹, N. de B. Randriamora

¹Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire, Ministère de l'Agriculture et de l'Elevage, Antananarivo, Madagascar

Correspondant : t.randriamparany@gmail.com

I. Résumé

L'élevage porcin se caractérise par un taux de croissance annuel de 4% devant ceux des bovins (2,6%), des ovins (2,13%) et des caprins (2,26%) qui est très favorable pour développer cette filière ainsi que la vie des éleveurs. Cependant, la Peste Porcine Africaine est une maladie virale très contagieuse de porc domestique et sauvage qui ravage le cheptel. L'exigence des chaînes de froid empêche parfois l'envoi des prélèvements du terrain au laboratoire qui est nécessaire pour diagnostiquer cette maladie.

La méthode utilisant le papier buvard Whatman 3MM pour transporter et analyser la Peste Porcine Africaine lors des cas sporadiques a été avancé pour le diagnostic de la PPA dans trois localités de Madagascar. Il s'agit d'un test PCR direct (conventionnel) et du test ELISA sur des échantillons de sang prélevés sur du papier buvard. Après imprégnation, le papier buvard est séché et un fragment d'environ 2 mm² ou 40mm² est placé directement dans un tube PCR ou sur la plaque ELISA respectivement, dans lequel est ajouté le mélange réactionnel.

Au total 65 porcs ont été analysés au cours de cette étude. La prévalence de l'infection était globalement de 40% (IC95% : 27,85 – 52,15) pour la détection virale par PCR direct utilisant le papier buvard Whatman 3 MM, et 0% pour la sérologie ELISA.

L'utilisation de cette technique a donné des résultats prometteurs et a permis de sauver plusieurs fermes à Madagascar depuis 2019. Sur cette étude, le papier buvard Whatman 3MM a prouvé être un support pour collecte, de stockage de sang de porc venant d'une localité lointain sans utiliser le chaîne de froid pour détecter la présence de la peste porcine africaine à Madagascar.

Mots-clés : PPA, papier filtre Whatman 3MM, Diagnostic, ELISA, PCR

II. Introduction

La Peste Porcine Africaine (PPA) est une maladie virale très contagieuse, causée par un virus appartenant à la famille Asfaviridae et au genre *Asfivirus* (Dixon, 2005), elle est transmissible et affectant les suidés sauvages et domestiques et a de caractéristiques épidémique très sévères avec des taux de mortalité très élevées (Grangé, 2016 ; Atuhairwe, 2013). A Madagascar, cette maladie était ignorée jusqu'à ce qu'il avait le premier diagnostic au mois de décembre 1998.

De nos jours, il n'existe ni traitement, ni vaccin efficace contre la PPA, donc le contrôle de la maladie ne peut se faire que par des mesures sanitaires. L'inexistence de prophylaxie médicale et de traitement de la PPA nécessite un diagnostic rapide pour pouvoir contrôler et éradiquer la maladie (Randriamparany, et al., 2016). Le diagnostic de la PPA repose sur la détection du virus ou sur la détection d'anticorps. Des nombreuses techniques peuvent être utilisées mais le choix d'un test dépend des moyens financiers, de matériels et techniques, de niveau d'urgence et de souche virale en question (Franco, 2006). Cependant, les pays à faible revenu sont vulnérables à cette maladie. Les papiers-filtres Whatman 3MM ne contiennent pas d'additifs; ils peuvent donc préserver l'infectivité et peuvent théoriquement être utilisés pour une amplification supplémentaire des agents pathogènes. Un autre avantage est qu'ils ne contiennent pas d'inhibiteur de PCR et peuvent être directement utilisés dans la PCR conventionnelle sans extraction préalable de l'acide nucléique. sans extraction préalable de l'acide nucléique, comme cela a déjà été démontré dans la détection de l'ASFV (Michaud et al., 2007). Sur la base de ces résultats, cette étude a été conçue pour évaluer si les papiers filtres Whatman 3-MM peuvent être utilisés pour diagnostic de la peste porcine africaine à l'aide d'une série de tests actuellement disponibles qui ont été conçus à l'origine pour la détection du virus de la peste porcine africaine et des anticorps dans des échantillons biologiques conventionnels. L'objectif de cette étude est l'utilisation de papier buvard Whatman 3MM pour collecter du sang de porc. Ce même prélèvement est utilisé pour détecter à la fois le virus de la PPA en utilisant la technique PCR, et la présence d'anticorps circulant lors d'une infection virale par Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Cette technique est rapide, facile à réaliser et n'utilise pas des chaîne de froid qui d'habitude pause des problèmes dans la majorité des pays en développement.

III. Matériels et méthodes

III.1. Matériels

Cette étude est réalisée dans trois différentes localités de Madagascar pour diagnostiquer des suspicions de la PPA à Arivonimamo, à Port Bergé et à Vangaindrano en 2021. Les échantillons utilisés sont des papiers buvards qui ont été imprégnés au sang de porc abattus, puis séché et conservé dans une enveloppe à température ambiante jusqu'à leur utilisation. Les prélèvements sont ensuite envoyés et testés au Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire sis à Itaosy, Antananarivo. Les analyses des prélèvements ont été effectuées au Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire (LNDV), sis à Itaosy, Antananarivo 102.

III.2. Méthodes

III.2.1. Préparation des échantillons

a) Préparation du papier filtre

Les papiers buvards Whatman 3MM, qui sont souvent utilisés pour le stockage et la détection de matériel génétique ou protéique, ont été sélectionnés pour cette étude. Les papiers buvards 3MM ont été découpés en bandes de 5 x 0,5 cm. Les bandes ont été trempées (Figure 1) dans du sang total prélevé sur des porcs abattus et laissées à sécher.



Figure 1 : Collecte de prélèvement sur papier buvard Whatman 3MM lors du saignement d'un porc

Une fois séchés, les papiers-filtres ont été conservés à température ambiante (22-25°C) ou à 37°C jusqu'à leur utilisation (Figure 2).

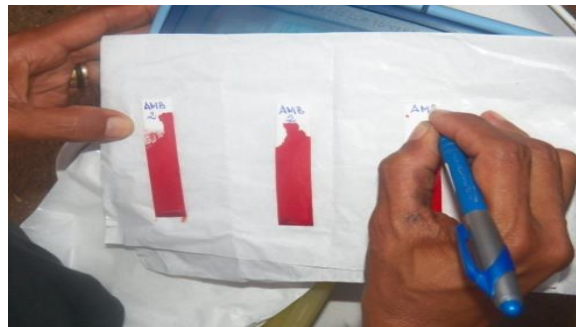


Figure 2 : Stockage à température ambiante des papiers buvards

b) Échantillons conventionnels

Pour les échantillons de tissus et de sang, les acides nucléiques viraux ont été préparés à l'aide du mini kit QIAamp viral DNA (QIAGEN, Venlo, Pays-Bas) comme décrit King et collaborateurs en 2003 et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse ultérieure par PCR.

III.2.2. Procédures de diagnostic

a) PCR directe conventionnelle

La région hautement conservée du génome codant pour la protéine p72 du virus de la PPA a été amplifiée par PCR en utilisant le 5 prime Mastermix (Eppendorf, Montesson, France). Des papiers filtres 3-MM avec le sang séché des porcs infectés a été directement placé dans des tubes PCR sans extraction préalable de l'acide nucléique. Un morceau de papier filtre de 2 mm² a été placé dans chaque tube PCR de 0,2 ml. Le mélange réactionnel a été ajouté à un

volume final de 50 µl pour permettre une immersion correcte des papiers filtres. Le mélange réactionnel mélange réactionnel contenait 0,4 µM d'amorce directe : 5'-T C G G G A G A TG T T C C A G G T A G G-3' et une amorce inverse : 5'-G C A AAA G G A T TT G G T G A A T-3'. La PCR a été réalisée comme suit : (i) 5 min à 95°C ; (ii) 35 cycles pour 30 s à 95°C, 30 s à 55°C, et 30 s à 72°C ; (iii) 7 min à 72°C.

Un fragment PCR de 346 paires de bases a été visualisé sur gel d'agarose. Un contrôle négatif provenant d'un porc non infecté a été inclus. La taille des fragments a été définie par comparaison avec échelles d'ADN.

En utilisant le même mélange maître et les mêmes amorces, 15 µl d'ADN extrait du sang et des tissus ont été analysés dans des volumes finaux de 50 µl. Le mélange réactionnel a été traité comme suit : (i) 5 min à 95°C ; (ii) 35 cycles, 30 s à 95°C, 30 s à 60°C et 30 s à 72°C ; (iii) 10 min à 72°C.

b) Elution d'anticorps à partir de papiers filtres 3MM pour la détection d'anticorps par ELISA et évaluation des performances du test.

Des échantillons appariés (papiers filtres 3-MM contenant du sang et des sérums séchés) ont été prélevés sur des porcs infectés expérimentalement.

Un morceau de 40 mm² de papier filtre 3-MM contenant du sang séché a été prélevé et ajouté à un volume de 100 µl de tampon ELISA (Ingezim PPA Compac, Ingenasa, Espagne). Après une incubation de 2 heures, l'éluat a été recueilli et testé dans le kit ELISA spécialement conçu par la société à cet effet. Les sérums ont été testés dans la version commerciale de ce kit selon les instructions du fabricant.

IV. Résultats

Pendant l'année 2021, Soixante cinq (65) prélèvements de papiers buvards imbibés de sang de porc ont été recueillis et reçus au laboratoire. Dans la Commune d'Imeritsiatosika 14 prélèvements ont été collectés après la demande d'un éleveur de porc au mois de Mars 2021. 25 prélèvements de porcs ont été reçus de l'abattoir de Vangaindrano los d'une étude en juin 2021. 26 prélèvements ont ensuite récupérés après une mission effectuée dans les élevages dans la Commune d'Antafiakatsaka, district de Port-Bergé en décembre 2021.

Les prélèvements reçus ont été analysés par deux techniques de diagnostic de la PPA. C'est la détection d'anticorps par ELISA et la recherche de circulation virale par PCR.

Utilisant comme prélèvement le papier buvard 3MM, la détection du virus de la peste porcine africaine par PCR nous a donné des prélèvements positifs 26/65, qui valent la prévalence globale des prélèvements 40% (IC95% : 27,85 – 52,15). Lors de la détection d'anticorps PPA, on ne trouve pas de résultat positif sur 65 prélèvements. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 1.

Tableau 1: Détection du virus PPA par la techniques PCR en utilisant des prélèvements de papiers filtres 3MM imbibés de sang de porc

Année	Région	District	Commune	Papiers Filtres 3MM			Nombre de porcs dans la commune
				Collectés	Pos PCR (%)	Pos Anticorps	
2021	Itasy	Arivonimamo	Imeritsiatosika	14	9 (64,29)	0	3500
	Sofia	Port Bergé	Antafiakatsaka	26	14 (53,84)	0	1600
	Fitovinany	Vangaindrano	Vangaindrano	25	3 (12)	0	1000
Total				65	26 (40)	0	6100

Pos : positif

V. Discussion

Dans cette étude, la performance des papiers filtre Whatman 3MM pour la collecte du sang sur papier buvard et leur conservation à température ambiante (>22°C) avec les procédures de diagnostic actuellement a donné des résultats convaincant pour la détection de la peste porcine africaine.

Nous n'avons pas trouvé des échantillons positifs lors des analyses des papiers buvards 3MM utilisant le Kit ELISA. Ce résultat nous suggère qu'il n'y a pas encore d'anticorps circulant dans le sang de l'animal qui sont détectés autour du 14è jour d'incubation du virus. Une autre idée suggère que de faibles concentrations d'anticorps peuvent ne pas être détectées dans les papiers filtres 3MM par rapport aux sérums.

Par contre, une prévalence de 40% a été retrouvée en utilisant les techniques moléculaires qui constituent les procédures de diagnostic les plus populaires utilisées pour l'identification rapide des maladies animales et humaines.

Dans cette étude, il a été démontré que les papiers-filtres 3MM présentent un avantage remarquable par rapport aux matériaux biologiques conventionnels, car l'extraction des acides nucléiques n'est pas nécessaire. Ainsi, pour pouvoir réaliser des PCR directes, conventionnelles, implique une réduction considérable du temps nécessaire au diagnostic moléculaire et du coût. En outre, un autre avantage potentiel est la réduction des contaminations potentielles pendant le traitement de l'échantillon. Il a été possible d'utiliser des papiers filtres Whatman 3MM collectés dès 2-3 jours après l'infection dans des PCR directes conventionnelles ou en temps réel pour une détection précoce ou en temps réel pour la détection précoce du génome de la PPA dans les trois différentes expériences. Selon Randriamparany et al 2016, le virus de la peste porcine africaine a été détecté pendant au moins 9 mois à température ambiante (22-25°C) et il est probable que même des températures plus élevées n'interfèrent pas avec la préservation du matériel et la détection du virus, comme l'ont montré d'autres auteurs (Michaud et al., 2007; Uttenthal et al., 2013).

VI. Conclusion

Les papiers buvards Whatman 3MM sont un moyen bon marché, simple et rapide pour la collecte de sang, la réservation et le diagnostic de la maladie de la peste porcine africaine par ELISA et par PCR directe conventionnelle. Parmi les avantages des bandes de papier buvard 3MM, évoquons le plus petit volume de sang nécessaire et la possibilité de collecter un grand nombre d'échantillons sur terrain. Les papiers buvards Whatman 3MM peuvent être utilisés comme un support multivalent pour un diagnostic polyvalent dans des conditions tropicales. Dans la section Matériels et méthodes, les papiers filtres 3MM conservés à la température ambiante doivent être élués pendant plusieurs minutes ou heures en les agitant dans le tampon approprié pour permettre la récupération des anticorps. Par contre, cet inconvénient n'existe pas pour les techniques moléculaires qui, après un test sérologique, constituent les procédures de diagnostic les plus populaires utilisées pour l'identification rapide des maladies animales et humaines. Les inconvénients trouvés pourraient être améliorés par optimisation de cette technique.

Références

Dixon LK, Escribano JM, Martins C, Rock DL, Salas ML et Wilkinson PJ. Asfarviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U et Ball(editors). Virus Taxonomy. VIII. Report of the ICTV, Elsevier, Academic Press, London; 2005. pp. 135–143.

Grangé, Tania. Risques épidémiologiques associés à l'élevage porcin à Madagascar : cas particulier de la peste porcine africaine dans les zones d'interface avec le potamochoère (potamochoerus larvatus). Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 156 p.

Atuhairwe KD, Ochwo S, Afayoa M, Mwine FM, Kokas I, Arinaitwe E et al. Epidemiological Overview of African Swine Fever in Uganda (2001–2012). Journal of Veterinary Medicine. 2013; 9: 263(Article ID 949638).

Franco, 2007. Epidémiologie de la peste porcine africaine dans la région du lac Alaotra (Madagascar) ; Etude des facteurs de risque et estimation de la prévalence. Thèse Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 150p

Randriamparany T, Grenier A, Tourette I, Maharavo Rahantamalala CY, Rousset D, Lancelot R. Epidemiological situation of African swine fever in Lake Alaotra Region (Madagascar) and possible consequences on the organization of disease control and surveillance. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 2005; 58: 15–20.

Randriamparany T, Kouakou KV, Michaud V, Fernáandez-Pinero J, Gallardo C, Le Potier MF, et al. African Swine Fever Diagnosis Adapted to Tropical Conditions by the Use of Dried-blood Filter Papers. *Transbound Emerg Dis.* 2016 Aug; 63(4):379–88. <https://doi.org/10.1111/tbed.12295> Epub 2014 Nov 27. PMID: 25430732

Michaud, V., P. Gil, O. Kwiatek, S. Prome, L. Dixon, L. Romero, M.-F. Le Potier, M. Arias, E. Couacy-Hymann, F. Roger, G. Libeau, and E. Albina, 2007: Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *J. Virol. Methods* 146, 257–265.

Uttenthal, A., U. C. Braae, H. A. Ngowi, T. B. Rasmussen, J. Nielsen, and M. V. Johansen, 2013: ASFV in Tanzania: asymptomatic pigs harbor virus of molecular similarity to Georgia 2007. *Vet. Microbiol.* 165, 173–176.