



Méthodes

Sérodiagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine par immunoblotting

Patrice Gaurivaud (patrice.gaurivaud@anses.fr), François Poumarat (francois.poumarat@anses.fr)

Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des ruminants, Lyon, France

P. Gaurivaud, F. Poumarat (2012). Sérodiagnostic de la Péripneumonie contagieuse bovine par immunoblotting, N°8, ER08-12ME01 <http://www.anses.fr/euroreference/numero8/>

La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) est une maladie bactérienne des bovinés causée par *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony (MmmSC). Cette maladie est inscrite sur la liste de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), sa déclaration est obligatoire sur le territoire national avec comme conséquences des contraintes sanitaires importantes : dépeuplement, restrictions de circulation et d'exportation.

Autrefois fléau mondial de l'élevage, la PPCB aujourd'hui ne persiste plus qu'en Afrique et localement en Asie. L'Europe est considérée indemne depuis 1900, malgré plusieurs résurgences localisées depuis. La dernière résurgence fut de grande ampleur, elle affecta tout le sud-ouest de l'Europe entre 1980 et 1999. Elle résultait de la propagation insidieuse d'un nouveau variant de MmmSC moins virulent (Nicholas *et al.*, 1996).

Les formes frustes et chroniques de PPCB sont difficiles à dépister. Elles sont la principale source de dissémination et ne sont souvent détectables que par la mise en place d'un dépistage sérologique systématique. Cette évolution subclinique est de règle lors d'infection par le variant européen contemporain de la PPCB. La fixation du complément et l'ELISA-compétition sont les tests sérologiques préconisés par l'OIE, mais leurs manques de sensibilité font qu'ils sont peu efficaces dans un contexte de prévalence faible et pour la forme de PPCB européenne dont la souche est moins immunogène. Seule la mise en place systématique du test d'immunoblotting (TIB) en Europe a permis d'éliminer la maladie dans les dernières zones infectées en 1999 au Portugal alors que toutes les autres stratégies avaient échouées (Nicholas *et al.*, 2008). Ce test très sensible et très spécifique (Schubert *et al.*, 2011) est préconisé par l'OIE comme test d'expertise. Cependant la technique telle qu'elle est décrite dans le manuel de l'OIE (2008) manque de reproductibilité et de robustesse, en effet une grande hétérogénéité de résultats entre laboratoires a été constatée lors de l'unique essai d'aptitude inter-laboratoire international intégrant ce test en 2009. Dans le présent document sont proposés des aménagements permettant de standardiser la fabrication des réactifs et la réalisation du sérodiagnostic afin d'en améliorer la reproductibilité et d'assurer une démarche qualité.

Fabrication des réactifs : choix de la souche, préparation de l'antigène et contrôles préalables

Le choix de la souche est un point extrêmement critique, l'utilisation de la souche B103, souche de référence utilisée pour la mise au point de la méthode par Regalla *et al.* en 1999 est fortement recommandée et devrait être utilisée pour une harmonisation des résultats entre les laboratoires. L'antigène est alors préparé à partir d'une culture en milieu liquide spécifique pour mycoplasmes (Poumarat *et al.*, 1991) concentrée pour atteindre 10^{11} - 10^{12} cfu/mL (tableau 1). Il est impératif au préalable de s'assurer que la culture de MmmSC exprime correctement les 5 protéines spécifiques ciblées dans le TIB, respectivement de 110, 98, 95, 60-62 et 48 kDa, telles que définies par Gonçalves *et al.* (1998). En effet selon la souche de MmmSC utilisée mais également selon le clone sélectionné, ces protéines peuvent être plus ou moins exprimées. Ainsi chaque lot d'antigène devra être évalué avant toute utilisation avec des sérums de référence positifs et négatifs (tableau 1). Il convient de s'assurer de l'absence d'une contamination de la culture par d'autres mycoplasmes. La détection de contamination faible se faisant par « colonies blotting » sur gélose (Gaurivaud *et al.*, 2004) à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique de MmmSC (Brocchi *et al.*, 1993). Le concentré protéique obtenu à partir de mycoplasmes se conserve sous forme d'aliquotes un an à -20°C.



Production des bandelettes antigéniques

Le manuel de l'OIE préconise une séparation des protéines de l'extrait préparé en gradient de polyacrylamide 5-15 % sur la base des travaux de Gonçalves *et al.* (1998). Ce gradient permet la séparation optimale de l'ensemble des protéines de MmmSC et a permis à Gonçalves et collaborateurs d'identifier le consensus des protéines antigéniques spécifiques à



Méthodes

MmmSC. Cependant la séparation est optimale uniquement si ces protéines se trouvent dans la zone du gradient adéquate pour leur masse moléculaire, et, en pratique on est confronté à un problème récurrent de reproductibilité difficile à maîtriser, principalement pour les deux protéines de 95 et 98 kDa. L'utilisation de gel à 7% d'acrylamide (Schubert *et al.*, 2011) permet un compromis, une bonne séparation de ces protéines

et une meilleure reproductibilité entre les lots de bandelettes. Afin de réduire le temps de préparation, des gels commerciaux prêts à l'emploi tel que les gels NUPAGE Tris-Acétate 7% d'Invitrogen et Mini-Protean TGX Any kD de Bio-Rad (figure 1 A) sont utilisables. Les gels Mini-Protean TGX Any kD ont été choisis en raison de l'homogénéité d'intensité des bandes de 95 et 98 kDa lors du TIB avec un sérum positif. À noter que

Tableau 1. Description des étapes du sérodiagnostic de la PPCB par le test d'immunoblotting (TIB)

Étapes	Méthodes	Notes techniques	Contrôles qualité
Préparation de l'antigène	Préculture en milieu mycoplasme liquide (Poumarat <i>et al.</i> , 1991) de la souche B103 (isolée au Portugal en 1986 à partir de poumon de bovin, Gonçalves <i>et al.</i> , 1998)	La souche B103 est disponible au LNIV (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa, Portugal) et à l'Anses, Laboratoire de Lyon (UMR Mycoplasmoses des Ruminants, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 07)	
	Ensemencement au 1/100 de 150 ml de milieu mycoplasme liquide. Incubation à 37°C, 5% CO ₂ , 48 à 66 h		Absence de contamination mycoplasmatique vérifiée par « colonies blotting » avec un anticorps spécifique de MmmSC
	Centrifugation à 12 000g, 30 min à 4°C. Les culots de mycoplasmes sont lavés trois fois en tampon PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH7,4)		
	Le culot est remis en suspension avec 1 ml de tampon PBS. L'homogénéisation est assurée par passages à travers une aiguille fine. Le concentré de mycoplasmes est conservé un an à -20°C sous forme d'aliquotes de 50 µl		La présence des protéines de 110, 98, 95, 60-62 et 48 kDa est contrôlée par TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs ⁽¹⁾
Production des bandelettes antigéniques	Un volume de l'antigène dilué au 1/2 en eau purifiée est mélangé à 1 volume de tampon Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% glycérol, 2% SDS, 0,01% bleu de bromophénol, 5% β-mercaptoéthanol) puis porté à ébullition 5 mn	Le tampon de dénaturation a une influence sur la qualité de séparation des protéines. Tout tampon autre que le Laemmli devra être validé par TIB	
	Séparation par électrophorèse, en gel Mini-Protean TGX Any kD de Bio-Rad (tampon tris 2,5 mM, glycine 19,2 mM, SDS 0,01% pH 8,3) ou en gel NUPAGE Tris-acétate 7% (tampon NUPAGE tris acétate SDS) d'Invitrogen, selon les recommandations des fournisseurs	L'électrophorèse est arrêtée lorsque la protéine de 40 kDa du marqueur « NOVEX Sharp protein standard » d'Invitrogen est en bas du gel	
	Equilibre du gel, de la membrane de nitrocellulose (0,45 µm) et des papiers buvards (« extra thick blot paper » Bio-Rad référence 170-3969) en tampon Towbin (25 mM Tris, 192 mM glycine) pendant 5 mn à température ambiante		
	Transfert semi sec en tampon Towbin 30 à 45 mn à 25 V avec le Transblot SD ou le Transblot Turbo de Bio-Rad		La qualité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane avec le R-RPOB de Sigma-Aldrich (selon les instructions du fournisseur). La membrane est décolorée avec de l'EDTA 10 mM pH 8,0 et rincée deux fois à l'eau purifiée
	Saturation de la membrane avec 40 ml de solution de saturation par membrane, 2 heures à température ambiante		Contrôle des lots de solution de saturation par TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs
	Solution de saturation : lait écrémé en poudre 50 g/l, glycine 75 g/l, ovalbumine 10 g/l, conservée six mois à -20°C		
	Lavage de la membrane à température ambiante trois fois 15 mn avec 40 ml de tampon TBS 0,1% tween 20 et une fois 15 mn avec 40 ml de tampon TBS	L'omission du lavage après saturation de la membrane réduit l'intensité de la réaction	
	TBS : 20 mM Tris, 500 mM NaCl pH 7,4		
Découpe de la membrane en bandelettes antigéniques constituant un lot unique. Elles sont séchées à température ambiante puis conservées en tube hermétique à -20°C pendant un an		Deux bandelettes par lot sont contrôlées en TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs	

(1) Les sérums de référence positifs employés sont les sérums 511-49 et 511-56 provenant de l'étude d'Abdo *et al.* en 1998. Les sérums de référence négatifs proviennent de bovins français sains et testés négatifs pour la PPCB par ELISA-compétition et TIB



Méthodes

Tableau 1. Description des étapes du sérodiagnostic de la PPCB par le test d'immunoblotting (TIB) (suite)

Étapes	Méthodes	Notes techniques	Contrôles qualité
Sérodiagnostic par TIB	Pour chaque sérum une bandelette antigénique est immergée dans 1 ml de solution de dilution et 200 µl de sérum puis incubée 2 heures à température ambiante sous agitation douce. La solution de dilution : 0,1% lait écrémé en poudre (Bio-Rad « blotting-grade blocker » référence 170-6404), 0,1% ovalbumine, conservée 6 mois à -20°C		Les lots de solution de dilution sont contrôlés par TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs. Un sérum de référence positif et un négatif sont utilisés comme témoins pour chaque lot de bandelettes
	Lavage des bandelettes à température ambiante trois fois 15 mn en tampon TBS 0,1% tween 20 et une fois 15 mn en tampon TBS		
	Dilution de l'anticorps secondaire en solution de dilution. Un ml est rajouté à chaque bandelette puis incubée 2 heures à température ambiante sous agitation douce. L'anticorps secondaire : anti-IgG de bovin couplé à la peroxydase, purifié par immuno-affinité (Sigma-Aldrich référence A5295)		La dilution de l'anticorps secondaire est déterminée au cours d'un contrôle à réception réalisé pour chaque nouveau lot par TIB avec les sérums de référence positifs et négatifs
	Lavage des bandelettes à température ambiante trois fois 15 mn en tampon TBS 0,1% tween 20 et une fois 15 mn en tampon TBS		
	Lors du dernier lavage la solution de révélation est préparée (30 mg de 4-chloro-1-naphthol dissous dans 10 ml de méthanol, additionnés de 50 ml de PBS et 30µl de peroxyde d'hydrogène 30%)		Test des lots de 4-chloro-1-naphthol en dot blot avec des dilutions de l'anticorps secondaire pour évaluer la réaction et la présence de dépôt non spécifique
	Incubation des bandelettes avec 2 ml de la solution de révélation jusqu'à développement de la coloration. La réaction est arrêtée par lavage des bandelettes à l'eau purifiée	Le temps de développement de la réaction est basé sur les témoins positifs et négatifs	
	Interprétation des résultats par comparaison avec les témoins positifs et négatifs		

tous les gels commerciaux n'assurent pas la séparation des protéines de 95 et 98 kDa (exemple : gels Mini-Protean TGX 7,5% de Bio-RAD).

Après électrophorèse, le transfert des protéines du gel sur membrane de nitrocellulose par électro-transfert semi-sec (Gravel, 2002) offre plusieurs avantages par rapport au transfert par immersion : un gain de temps, le transfert de plusieurs gels simultanément et l'utilisation d'un générateur classique car il nécessite moins de puissance (Kurien et Scofield, 2006 ; MacPhee, 2010). Le transfert des protéines allant de 48 kDa à 110 kDa, est obtenu avec 30 à 45 min à 25 V en tampon Towbin, avec le transblot SD ou le transblot turbo (Bio-Rad) (tableau 1). Lors de l'assemblage des papiers buvards, gels et membranes, une bulle ou un débris de gel peuvent gêner le transfert. Une ou plusieurs protéines sont alors absentes sur une piste la membrane (correspondant à une bandelette antigénique). Comme le contrôle des lots se fait sur deux bandelettes présent au hasard, un problème de transfert sur une piste peut passer inaperçu et engendrer un faux négatif ou un résultat ininterprétable retardant l'analyse. Il est donc impératif de contrôler l'homogénéité et la qualité du transfert par l'utilisation d'un système de coloration réversible qui n'interfère pas avec le TIB tel que le réactif R-PROB de Sigma-Aldrich (MacPhee, 2010). Cette étape permet aussi le marquage des pistes afin de préparer la découpe de la membrane en bandelettes et aussi de tracer les fronts de migration pour pouvoir aligner et comparer les bandelettes entre elles et ainsi minimiser les effets des bords. Les membranes sont ensuite saturées (tableau 1) et découpées en bandelettes antigéniques. En utilisant les gels pré-coulés et l'électrotransfert semi-

sec, cinq heures sont suffisantes en partant de l'antigène congelé pour la préparation des bandelettes antigéniques. Le nombre produit va dépendre du système choisi allant de 20 à 50 bandelettes. Les bandelettes sont séchées (il est donc préférable d'utiliser les membranes de nitrocellulose, plus facile à réhydrater par rapport aux membranes de polyvinylidène fluorure) et conservées à -20°C pour une période d'un an dans un flacon hermétique. Les réactifs ainsi préparés permettent de réaliser le sérodiagnostic par TIB en 6 heures.

Le sérodiagnostic par TIB

Chaque sérum à tester est dilué au 1/6 dans une solution de dilution dont la composition (tableau 1) influence l'intensité de la réaction et le bruit de fond. Le lait écrémé en poudre du commerce, couramment utilisé en western blotting (MacPhee, 2010), est déconseillé en raison d'une part d'une trop grande variabilité suivant les lots et les fournisseurs, et d'autre part de la présence d'un bruit de fond important avec certains sérums perturbant l'interprétation (figure 1B). Le lait écrémé commercialisé par Bio-Rad permet de contenir ce bruit de fond (figure 1C). Tout nouveau lot de lait écrémé doit être pré-évalué par des essais en TIB avec des sérums de référence positifs et négatifs.

Les anticorps secondaires préconisés sont des anti-IgG de bovin purifiés par immuno-affinité (Sigma-Aldrich) assurant ainsi la spécificité de détection. Un contrôle à réception de chaque nouveau lot permet de déterminer la dilution appropriée afin de garder une sensibilité similaire entre les lots d'anticorps.



Méthodes

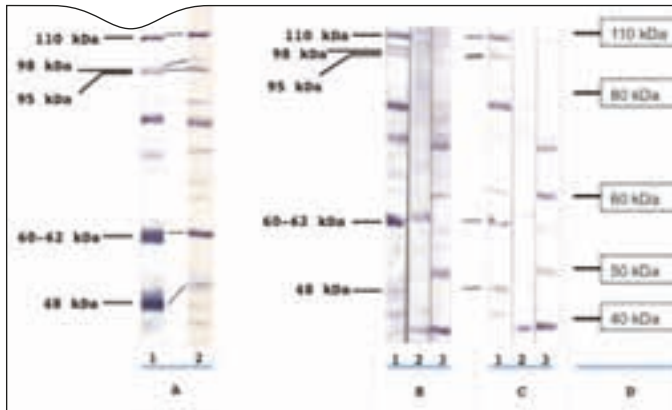


Figure 1. Test d'immunoblotting pour le sérodiagnostic de la PPCB, influence du type de gel et de la solution de dilution des sérums sur les profils obtenus.

A : profil d'un sérum positif ; avec les gels Mini-Protean TGX Any kD de Bio-Rad (piste 1) ou avec les gels NUPAGE 7% Tris-acétate d'Invitrogen (piste 2),

B et C : les sérums d'essai ont été dilués dans la solution de dilution réalisée avec du lait écrémé en poudre de commerce (B) ou avec le lait écrémé de Bio-Rad (C). La piste 1 correspond à un sérum positif et les pistes 2 et 3 à deux sérums négatifs,

D : représentation schématique de la position des protéines du marqueur de masses moléculaires (Novex sharp protein standard d'Invitrogen)

Pour la lecture des résultats, il est essentiel de bien identifier la position des bandes de 110, 98, 95, 60-62 et 48 kDa par l'utilisation systématique d'un sérum témoin positif dont le profil en TIB est bien caractérisé (sérum de référence, tableau 1). L'identification des bandes d'intérêts est aussi facilitée par l'emploi de plusieurs marqueurs de masses moléculaires différents (Sagedi *et al.*, 2003) et d'un sérum témoin négatif. Alors, l'interprétation des résultats se fait par comparaison des profils des témoins à ceux obtenus avec les sérums à tester. L'interprétation du TIB peut parfois s'avérer délicate lorsque des bandes apparaissent à proximité des bandes définies comme spécifiques, un effet de bord pouvant entraîner un léger décalage. En cas extrême, une bandelette sera découpée en deux dans le sens de la longueur, une partie sera révélée par le sérum positif et l'autre par le sérum ambiguë. La réunion des deux parties de la bandelette permet alors la comparaison précise du profil donné par un sérum par rapport à celui du témoin positif.

En conclusion, la définition des consommables et étapes critiques du TIB permet d'améliorer significativement la répétabilité du TIB et devrait pouvoir assurer une bonne reproductibilité, le point faible apparent du TIB constaté lors de l'EILA de 2009. En pratique courante, le TIB est régulièrement mis en œuvre dans nos laboratoires pour statuer sur des sérums trouvés douteux ou positifs, phénomène fréquent pour la fixation du complément et occasionnel en ELISA-compétition.

Références

Abdo el-M, Nicolet J, Miserez R, Gonçalves R, Regalla J, Griot C, Bensaïde A, Krampe M, Frey J. 1998. Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Veterinary microbiology*, 59:109-122.

Brocchi E, Gamba D, Poumarat F, Martel JL, De Simone F. 1993. Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia

through the use of monoclonal antibodies. *Revue scientifique et technique (International office of epizootics)*, 12(2): 559-570

Gaurivaud P, Persson A, Le Grand D, Westberg J, Solsona M, Johansson KE, Poumarat F. 2004. Variability of a glucose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. *Microbiology*, 150(12): 4009-4022

Gonçalves R, Regalla J, Nicolet J, Frey J, Nicholas R, Bashiruddin J, de Santis P, Gonçalves AP. 1998. Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Veterinary Microbiology*, 63: 13-28

Gravel, P. 2002. Protein blotting by semidry method. *In: The Protein Protocols Handbook*, 2nd edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ: 321-334

Kurien B T, Scofield R H. 2006. Western blotting. *Methods*, 38: 283-293

MacPhee D J. 2010. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61: 171-177

Nicholas R, Santini FG, Clark KM, Palmer NM, De Santis P, Bashiruddin JB. 1996. A comparison of serological tests and gross lung pathology for detecting contagious bovine pleuropneumonia in two groups of Italian cattle. *The Veterinary record*, 139:89-93.

Nicholas R, Ayling R, McAuliffe L. 2008. Antigenic analysis of *Mycoplasmas*. *In: Mycoplasma Diseases of Ruminants*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom: 53-57

OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2008. Chapter 2.4.9. Contagious bovine PleuroPneumonia. [consulté le 27 mars 2012] http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.09_CBPP.pdf

Poumarat F, Perrin B, Longchambon D. 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Veterinary microbiology*, 29:329-338

Regalla J, Gonçalves R, Niza Ribeiro J, Duarte L, Nicholas R, Bashiruddin JB, De Santis P, Garrido Abellan F, Penha Gonçalves A. 1999. Development of immunoblotting as a diagnostic tool for contagious bovine pleuropneumonia. *International Symposium – COST Action 826: Mycoplasma of Ruminants: pathology, diagnostic, epidemiology and molecular genetics. Joint Workshops of E.U. projects*, Toulouse, France, 109-112.

Sagedi M., Hajivandi M., Bogoev R, Amshey J. 2003. Molecular weight estimation of proteins by gel electrophoresis revisited. *Focus (Invitrogen)*, 25.3:35-39.

Schubert E, Sachse K, Jores J, Heller M. 2011. Serological testing of cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony using four different tests reveals a variety of seroconversion patterns. *BMC Veterinary research*, 7:72