



## Nouveaux tests de diagnostic équin par amplification isotherme

Thomas Thibault<sup>1</sup>, Mégane Simonnet<sup>1</sup>, Dove Cormier<sup>1</sup>, Viviane Luong<sup>1</sup>, Alban Lacaze<sup>1</sup>, Cindy Samson<sup>1</sup>, Clémentine Prat<sup>1</sup>, Laurent Thiery<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Enalees – Rue Henri Auguste Desbruères – Génomole Campus 1 Bâtiment 7 – 91000 Evry  
[contact@enalees.com](mailto:contact@enalees.com)



### Ce qu'il faut retenir

De nouveaux tests de diagnostic équin basés sur l'amplification d'ADN ont récemment été mis au point. Ces tests permettent une détection directe d'un pathogène en amplifiant leur ADN de façon extrêmement simple, sans matériel coûteux (à partir de 15 euros par test) et de façon très rapide (20 minutes).

Afin de vérifier la fiabilité de ces nouveaux outils de diagnostic, une validation partielle des kits a été réalisée en effectuant des tests de sensibilité, spécificité, inclusivité et exclusivité.

L'utilité d'un contrôle positif endogène a aussi été mise en évidence.

### 1 Contexte et objectifs

Actuellement, les tests de diagnostic équins pour les maladies infectieuses sont réalisés soit par PCR, ce qui conduit à des résultats très sensibles mais nécessite l'envoi auprès de laboratoires spécialisés qui ne pourront donner un résultat qu'après un ou plusieurs jours, soit par la détection d'anticorps ou d'antigènes présents dans le sérum, ce qui a pour inconvénient la génération de résultats généralement moins spécifiques qu'en PCR.

Récemment, de nouveaux types de tests de diagnostic moléculaire terrain utilisant une nouvelle technologie d'amplification d'ADN sont apparus sur le marché. Ces tests ont l'avantage de se dérouler en seulement 20 minutes et nécessitent un matériel peu coûteux.

A ce jour, 2 types de tests utilisant cette nouvelle technologie ont été développés, les tests ciblant les maladies à l'origine d'un syndrome Piro-like, ce qui permet la détection des pathogènes *Borrelia*, *Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma*, *Leptospira* et les tests ciblant les maladies à l'origine d'un syndrome respiratoire, ce qui permet la détection de EHV-1, EHV-4, la grippe équine (Virus H3N8) et la Gourme (*Streptococcus equi equi*).

Des expériences sont en cours concernant la sensibilité, la spécificité, l'inclusivité et l'exclusivité de ces tests détectant les pathogènes responsables d'un syndrome respiratoire et les premiers résultats seront présentés. Pour cela, différentes souches de pathogènes provenant de différents pays du monde et de différentes années ont été utilisées pour réaliser ces expériences. Des tests sur des prélèvements effectués en condition réelle ont été réalisés et les résultats ont été comparés avec des tests extérieurs afin de s'assurer de la validité des tests développés.

## 2 Méthode

Pour chaque kit développé, des expériences d’extinction sur un ADN de référence de chaque pathogène ont été réalisées avec les nouveaux kits de diagnostic moléculaires et en qPCR dans un laboratoire de référence afin de comparer ces 2 technologies.

La limite de détection de la technologie d’amplification d’ADN utilisée (appelée LD<sub>amp</sub>) correspond au nombre minimal de copies d’ADN du pathogène nécessaire pour que l’amplification de l’ADN du pathogène puisse se réaliser au cours du test dans 100% des cas. Dans l’idéal, afin de pouvoir détecter avec certitude un pathogène selon les conditions d’utilisation du kit, cette valeur devrait être inférieure à 100 copies/réaction.

L’inclusivité des nouveaux kits de diagnostic moléculaire utilisant la nouvelle technologie d’amplification d’ADN est déterminée en testant l’ADN de souches variées (différents pays et laboratoires) des pathogènes à détecter.

L’exclusivité des nouveaux kits de diagnostic moléculaire utilisant la technologie d’amplification d’ADN est déterminée en testant de fortes concentrations d’ADN de plusieurs souches de pathogènes non ciblés par le kit dans le but de vérifier la non-détection de l’ADN de ces pathogènes non ciblés.

La sensibilité des nouveaux kits de diagnostic moléculaire utilisant la nouvelle technologie d’amplification d’ADN est déterminée en testant des écouvillons nasopharyngés, fournis par un laboratoire de référence, connus comme étant contaminés par le pathogène d’intérêt ; un calcul est ensuite effectué en divisant le nombre de cas obtenus comme étant positifs par le nombre de cas total. Une sensibilité optimale est de 100%.

La spécificité des nouveaux kits de diagnostic moléculaire utilisant la nouvelle technologie d’amplification d’ADN est déterminée en testant des écouvillons nasopharyngés, fournis par un laboratoire de référence, connus comme n’étant pas contaminés par le pathogène d’intérêt ; un calcul est ensuite effectué en divisant le nombre de cas obtenus comme étant négatifs par le nombre de cas total. Une spécificité optimale est de 100%.

## 3 Résultats

### 3.1 EHV-1

#### 3.1.1 EHV-1 – Extinction et LDamp

Des expériences d’extinction sur un ADN de référence ont été réalisées et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par qPCR. La LD<sub>amp</sub> a également été déterminée à partir d’ADN quantifié.

Il est possible de constater que les résultats obtenus sont similaires entre le nouveau kit de diagnostic moléculaire et la PCR. De plus, la LD amplification a été déterminée à 1 copie/réaction, ce qui est excellent (résultat attendu <100 copies/réaction).

Tableau 1 : Expérience d’extinction sur un échantillon d’ADN de référence

	1	1/10 <sup>ème</sup>	1/100 <sup>ème</sup>	1/1.000 <sup>ème</sup>	1/10.000 <sup>ème</sup>	1/100.000 <sup>ème</sup>	1/1.000.000 <sup>ème</sup>
Kit de diagnostic EHV-1	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
PCR	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non

LD amplification : 1 copie/réaction

#### 3.1.2 EHV-1 - Inclusivité

Des ADN de 5 souches d’EHV-1 de différentes provenances (pays et laboratoires) ont été testés avec les nouveaux kits de diagnostic moléculaire. Tous les ADN de ces 5 souches ont bien été détectés à l’aide des nouveaux tests de diagnostic moléculaire.

Ainsi, l’inclusivité du kit semble tout à fait en adéquation avec ce qui peut être attendu pour un développement optimal des kits de diagnostic moléculaire.

#### 3.1.3 EHV-1 - Exclusivité

Des ADN de pathogènes non EHV-1 ont été testés avec les nouveaux kits de diagnostic moléculaire. L’ADN des 4 autres types d’herpès (EHV-2, EHV-3, EHV-4, EHV-5) n’ont pas été détectés, de même que l’ADNc de l’Influenza équin et l’ADN de *Streptococcus equi equi*.

Ainsi, l'exclusivité du kit semble tout à fait en adéquation avec ce qui peut être attendu pour un développement optimal des kits de diagnostic moléculaire.

### 3.1.4 EHV-1 - Sensibilité

Différents écouvillons nasopharyngés, fortement ou faiblement chargés en virus (12 écouvillons avec des Ct de PCR allant de 19.7 à 39), ont été testés à l'aide des nouveaux kits de diagnostic moléculaire. L'intégralité de ces tests ont donné un résultat positif quant à la présence de EHV-1. (Sensibilité = 100%)

Ainsi, la sensibilité du kit semble tout à fait en adéquation avec ce qui peut être attendu pour un développement optimal des kits de diagnostic moléculaire.

## 3.2 EHV-4

### 3.2.1 EHV-4 – Extinction et LD<sub>amp</sub>

Des expériences d'extinction sur un ADN de référence ont été réalisées et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par qPCR. La LD<sub>amp</sub> a également été déterminée à partir d'ADN quantifié.

Tableau 1 : Expérience d'extinction sur un échantillon d'ADN de référence

	1	1/10 <sup>ème</sup>	1/100 <sup>ème</sup>	1/1.000 <sup>ème</sup>	1/10.000 <sup>ème</sup>	1/100.000 <sup>ème</sup>	1/1.000.000 <sup>ème</sup>
Kit de diagnostic EHV-4	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non
PCR	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non

LD amplification : 40 copies/réaction

Il est possible de constater que les résultats obtenus sont similaires entre le nouveau kit de diagnostic moléculaire et la PCR. De plus, la LD amplification a été déterminée à 40 copies/réaction, ce qui est excellent (résultat attendu <100 copies/réaction).

### 3.2.2 EHV-4 - Exclusivité

Des ADN de pathogènes non EHV-4 ont été testés avec les nouveaux kits de diagnostic moléculaire. Les ADN d'autres types d'herpès (EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-5) n'ont pas été détectés, de même que l'ADNc de l'Influenza équin et l'ADN de *Streptococcus equi equi*.

Ainsi, l'exclusivité du kit semble tout à fait en adéquation avec ce qui peut être attendu pour un développement optimal des kits de diagnostic moléculaire.

## 3.3 Influenza Equin

### 3.3.1 Influenza équin – Extinction et LD<sub>amp</sub>

Des expériences d'extinction sur un ADNc de référence ont été réalisées et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par qPCR. La LD<sub>amp</sub> a également été déterminée à partir d'ADNc quantifié.

Tableau 1 : Expérience d'extinction sur un échantillon d'ADNc de référence

	1	1/10 <sup>ème</sup>	1/100 <sup>ème</sup>	1/1.000 <sup>ème</sup>	1/10.000 <sup>ème</sup>	1/100.000 <sup>ème</sup>	1/1.000.000 <sup>ème</sup>
Kit de diagnostic Influenza équin	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non
PCR	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non

LD amplification : 9 copies/réaction

Il est possible de constater que les résultats obtenus sont similaires entre le nouveau kit de diagnostic moléculaire et la PCR. De plus, la LD amplification a été déterminée à 9 copies/réaction, ce qui est excellent (résultat attendu <100 copies/réaction).

### 3.3.2 Influenza équin - Inclusivité

Des ARN Influenza équin de souches de différentes provenances (pays et laboratoires) ont été testés avec les nouveaux kits de diagnostic moléculaire. Tous les ARN de ces 6 souches ont bien été détectés à l'aide des nouveaux tests de diagnostic moléculaire. De plus, il est à noter que l'ARN de la souche de grippe circulant en Europe depuis fin 2018 est bien détecté.

Ainsi, l'inclusivité du kit semble tout à fait en adéquation avec ce qui peut être attendu pour un développement optimal des kits de diagnostic moléculaire.

### 3.3.3 Influenza equin - Exclusivité

Des ADN de pathogènes non-Influenza equin ont été testés avec les nouveaux kits de diagnostic moléculaire. Les ADN des herpès EHV-1, EHV-4 et l'ADN de *Streptococcus equi equi* n'ont pas été détectés.

Ainsi, l'exclusivité du kit semble tout à fait en adéquation avec ce qui peut être attendu pour un développement optimal des kits de diagnostic moléculaire.

## 3.4 Streptococcus equi equi

### 3.4.1 Streptococcus equi equi –LD<sub>amp</sub>

La LD amplification a été déterminée à partir d'ADN quantifié, à 40 copies/réaction, ce qui est excellent (résultat attendu <100 copies/réaction).

### 3.4.2 Streptococcus equi equi - Exclusivité

Des ADN de pathogènes non-*Streptococcus equi equi* ont été testés avec les nouveaux kits de diagnostic moléculaire. L'ADN d'autres types de streptococcus (*Streptococcus equi zooepidemicus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*), l'ADN des herpès EHV-1, EHV-4 et l'ADNc de l'Influenza equin n'ont pas été détectés.

Ainsi, l'exclusivité du kit semble tout à fait en adéquation avec ce qui peut être attendu pour un développement optimal des kits de diagnostic moléculaire.

### 3.4.3 Streptococcus equi equi - Sensibilité

Différents écouvillons naso pharyngés, fortement ou faiblement chargés en bactéries (24 écouvillons avec des Ct de PCR allant de 24 à 38.5 dont 16 fortement chargés (Ct<34) et 8 faiblement chargés (Ct>34)), ont été testés à l'aide de nouveaux kits de diagnostic moléculaire. Sur les 16 écouvillons fortement chargés, 15 ont été détectés positifs (sensibilité des cas fortement chargés = 94%). Sur les 8 écouvillons faiblement chargés, 4 ont été détectés positifs (sensibilité des cas faiblement chargés = 50%)

Ainsi, ce kit a une sensibilité de 94% pour les échantillons fortement chargés, ce qui est compatible avec la détection du pathogène chez des chevaux en phase clinique aigüe.

## 3.5 Présence d'un contrôle positif d'efficacité de prélèvement

Les nouveaux kits de diagnostic moléculaires utilisant la nouvelle technologie d'amplification d'ADN possèdent un contrôle positif endogène, et ce, à la différence de nombreux tests PCR utilisés dans les laboratoires d'analyses qui possèdent fréquemment un contrôle positif exogène. L'avantage de ce contrôle positif endogène que nous avons développé est qu'il permet de détecter directement l'ADN des cellules du cheval, ce qui permet de savoir si l'écouvillon a bien touché la paroi nasopharyngée afin d'être assez chargé en matériel biologique, et ainsi confirmer que le prélèvement a bien été effectué. Ceci constitue donc un contrôle qualité supplémentaire par rapport aux tests fréquemment effectués en laboratoire d'analyse PCR.

## 4 Applications pratiques

Les nouveaux kits de diagnostic moléculaires qui ont été développés ont montré des premiers résultats de validation très prometteurs. Il est ainsi possible aujourd'hui d'utiliser ces kits en tant qu'aide au diagnostic pour identifier le pathogène responsable d'une maladie respiratoire équine. Ces tests ont l'avantage d'amplifier et de permettre la détection de l'ADN du pathogène en seulement 20 minutes et sans matériel coûteux.

## 5 Perspectives

Une validation selon la norme NF U 47-600 2 sera effectuée prochainement par un laboratoire indépendant.