

P8607

DÉTECTION DU CORONAVIRUS DE LA GET ET DES ANTICORPS SPÉCIFIQUES PAR UNE TECHNIQUE ÉLISA MIXTE METTANT EN ŒUVRE ANTICORPS MONOCLONAUX ET POLYCLONAUX

S. BERNARD (1), H. LAUDE (2), I. LANTIER (1), Elisabeth BOTTREAU (1),
J.M. AYNAUD (1)

Institut National de la Recherche Agronomique

(1) *Laboratoire de Pathologie Porcine, NOUZILLY, 37380 MONNAIE*
(2) *Station de Virologie et d'Immunologie, 78850 THIVERVAL-GRIGNON*

INTRODUCTION

La gastro-entérite transmissible est une entérite virale du porc hautement contagieuse. Chez le jeune animal de moins de 15 jours cette maladie se traduit par des vomissements, de la diarrhée sévère qui évolue presque toujours vers une déshydratation et la mort du porcelet (BOHL, 1981, LAUDE, 1979). Bien que le tableau clinique soit caractéristique, ces symptômes ne permettent pas de faire la différence avec d'autres entérites virales ou bactériennes. Le diagnostic se fait soit par la recherche de l'agent infectieux, soit indirectement par la présence des anticorps dans le sérum de l'animal.

La recherche directe du virus se fait par réinfection de porcelets par des fécès ou des broyats d'intestin d'animaux malades (DULAC, 1977), par microscopie électronique (FLEWETT, 1978), ou par culture cellulaire *in vitro* (BOHL, 1981). Ces techniques difficiles à mettre en œuvre, d'interprétation délicate, ou alléatoire, sont peu employées. De façon presque aussi difficile, les antigènes viraux sont détectés dans les cellules épithéliales de l'intestin d'animaux infectés, par immunofluorescence.

Les anticorps sont généralement détectés par la technique de séroneutralisation (VANNIER, 1977), sensible, mais longue et laborieuse. La détection des anticorps par immunofluorescence indirecte sur coupe d'intestin congelé, par haemagglutination passive (SHIMIZU, 1977), ou par immunopéroxydase (KODAMA, 1980) est également utilisée. Récemment une technique ELISA, nécessitant du virus purifié a été décrite par NELSON, 1984, pour effectuer ces dosages.

L'objet de cette communication sera la présentation d'une technique ELISA « sandwich » capable de détecter, avec une bonne sensibilité les antigènes de virus de la gastro-entérite transmissible, non seulement à partir de souches cultivées *in vitro*, mais également à partir d'un lavage d'intestin de porcs infectés par une souche virulente du terrain. Nous décrirons également une technique ELISA permettant de détecter les classes d'anticorps anti-GET, en utilisant comme antigènes le matériel viral non purifié présent dans les surnageants de cultures cellulaires infectés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) VIRUS ET CELLULES

Nous avons utilisé la souche PURDUE-115 (LAUDE, 1981), et la souche mutante atténuée 188-SG (AYNAUD, 1985), comme source de virus produit sur culture cellulaire continue de reins de porc (lignée RP.D) (LAUDE. H, 1981, AYNAUD, 1984 a). Le titre infectieux de la souche PURDUE-115 était de $1,10^6$ Unités Formant Plages (UFP), et celui du mutant 188-SG de 1.10^5 UFP/ml.

La souche virulente Gep II a été isolée par VANNIER sur le terrain. Des porcelets dépourvus de colostrum ont été infectés oralement par cette souche. Le lavage de l'intestin grêle de ces animaux est collecté 18 heures après. Ces échantillons virulents jusqu'à la dilution 10^{-6} sont utilisés comme virus d'épreuve pour les porcelets (AYNAUD, 1985).

Toutes les souches sont conservées à -70 °C.

2) RÉACTIF DES RÉACTIONS ÉLISA

A) Anticorps polyclonaux de truie anti-GET

Le sérum de la truie 5215 (AYNAUD, 1985), vaccinée oralement par la souche 188-SG et éprouvée par la souche Gep II, a été utilisé pour fabriquer un conjugué anti-GET, marqué à la peroxydase. Le titre neutralisant élevé de cet échantillon, 1/65000, nous a permis d'obtenir un réactif dont l'activité spécifique était très satisfaisante.

B) Anticorps monoclonaux anti-GET

Des anticorps monoclonaux de souris, spécifiques des constituants structuraux de la particule virale, E1, E2, et nucléoprotéine, fabriqués par J. GROSCLAUDE et H. LAUDE, ont été utilisés pour les détections d'antigènes et d'anticorps.

C) Anticorps spécifiques des classes d'immunoglobulines porcines

Les conjugués anti-IgG et IgA, sont fabriqués extemporanément à l'aide d'anticorps spécifiques des classes d'immunoglobulines et des IgG et IgA marqués à la peroxydase (BERNARD. S, 1985).

3) RÉACTION ÉLISA

A) Détection des antigènes de *coronavirus* GET

Un système « sandwich » est utilisé pour détecter les antigènes du virus. Un mélange à partie égale de globuline de 3 anticorps monoclonaux de spécificité E1, E2, NP, est utilisé, à raison de 4,6 µg/ml pour tapisser le fond des cupules (50 µl/cupule). Une réaction témoin est effectuée en parallèle avec des globulines de souris non immunisées, dans les mêmes conditions (4,7 µg/ml). Après cette première étape, faite en tampon carbonate pH 9,6, et une incubation une nuit en présence de 100 µl de sérum albumine humaine (HSA) 2 % pour saturer tous les sites de la plaque, les autres dilutions sont réalisées en présence de 0,05 % de tween 20, et 1 % de gélatine. Des échantillons dilués (<10), dans ce tampon sont incubés 2 h à 37 °C. Le conjugué anti-GET-péroxydase est mis dans les mêmes conditions. La réaction colorée de l'ABTS (Boehringer), est lue au bout d'une heure à 405 nm au spectrophotomètre Vernon. Les résultats sont exprimés en différence de densité optique entre les essais obtenus avec les anticorps monoclonaux et les immunoglobulines non immunisées.

B) Détection des anticorps anti-GET

Le virus est attaché indirectement au fond la plaque, par les anticorps monoclonaux, dans les conditions décrites précédemment. Un volume de 100 µl de surnageant de culture de virus PURDUE, titrant $1,10^6$ UFP est ensuite déposé en tampon tween, HSA 1 % dans les cupules. Les plaques ainsi préparées servent à la détection des anticorps. Les dilutions de sérum et de lait sont incubées 2 heures à 37 °C. Les conjugués spécifiques des classes d'immunoglobulines sont enfin déposés sur les plaques. La lecture s'effectue comme décrite précédemment. Les résultats résultent de la différence entre les densités optiques obtenues avec les surnageants de culture cellulaire infectés et non infectés. La densité optique de la réaction est transformée en quantité d'immunoglobuline par un étalonnage de la réaction.

4) ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES

Les antigènes de *coronavirus* ont été recherchés non seulement dans les surnageants de cultures cellulaires infectées, mais également dans les lavages d'intestin ainsi que dans les fécès de porcs infectés.

Les anticorps ont été quantifiés dans le lait et le sérum de truies vaccinées et immunisées. Deux animaux ont été choisis pour visualiser les cinétiques d'apparitions d'anticorps détectables par la technique ELISA et d'anticorps neutralisants (AYNAUD, 1985). La première truie n° 5215 vaccinée 67 jours après l'insémination avec du virus 188-SG, n'a pas reçu de rappel. Sa portée a été éprouvée 6 jours après la mise-bas avec la souche de virus virulente Gep II. Cet animal n'a pas protégé ses porcelets. La portée de la seconde truie n° 18 vaccinée dans les mêmes conditions, et rappelée après 100 jours, a très bien résisté à l'épreuve virulente (AYNAUD, 1985).

RÉSULTATS

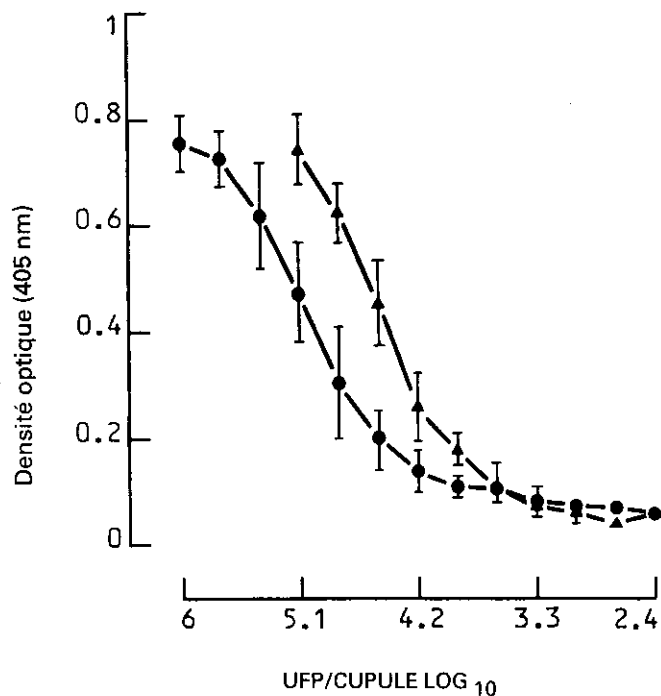
1) DÉTECTION DES ANTIGÈNES DU VIRUS DE LA GASTRO-ENTÉRITE TRANSMISSIBLE

A) Antigènes de culture cellulaire infectée

La figure 1 montre la densité optique de la réaction ELISA en fonction du pouvoir infectieux du surnageant de culture de la souche PURDUE-115 ou de la souche vaccinale 188-SG. La réaction témoin de cellules non infectées est inférieure à 0,1.

FIGURE 1

DÉTECTION DES ANTIGÈNES DU CORONAVIRUS DE LA GET CULTIVÉS EN CULTURE CELLULAIRE IN VITRO : Densité optique de la réaction ELISA à 405 nm. Souche PURDUE-115 (●-●), Souche 188-SG (▲-▲).

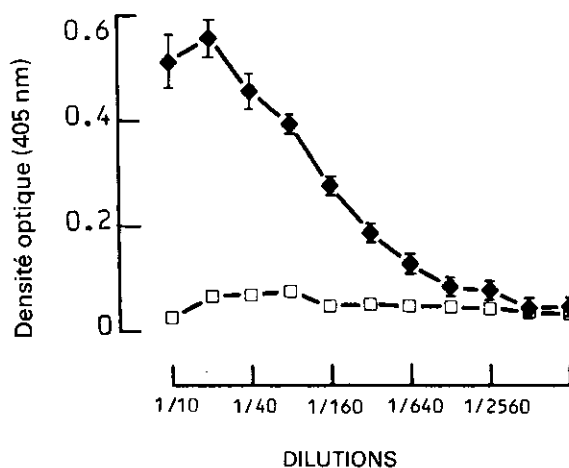


B) Antigènes d'une souche sauvage

La figure 2 montre la réaction ELISA, effectuée avec la souche virulente du terrain, Gep II. La réaction semble moins élevée comparée aux antigènes de culture, bien que la limite de sensibilité permette une détection des antigènes viraux entre 1/640 et 1/1200.

FIGURE 2

DÉTECTION DES ANTIGÈNES DE CORONAVIRUS DE LA GET D'UN LAVAGE D'INTESTIN DE PORCELETS infectés par la souche virulente GEP II : Densité optique de la réaction ELISA à 405 nm. Témoin cellulaire (□-□), Souche GEP II (◆-◆).



2) CINÉTIQUE D'APPARITION DES ANTICORPS ANTI-GET DANS LE SÉRUM ET LAIT DE TRUIES VACCINÉES ET AU CONTACT DE SES PORCELETS.

La recherche des anticorps dans le sérum et dans le lait de deux truies est montrée figures 3 et 4, les IgG anti-GET sont les immunoglobulines majoritaires dans le sérum. Les titres sont parfois supérieurs à 20 µg/ml. Pourtant la sensibilité de la séroneutralisation semble supérieure à ce type de détection. Les IgA anti-GET, sont représentées en grande quantité dans le lait. Les résultats sont identiques à ceux du sérum. Le titre en IgA anti-GET ne correspond pas parfaitement à l'activité neutralisante mesurée sur culture cellulaire.

FIGURE 3

CINÉTIQUE D'APPARITION DES ANTICORPS DANS LE LAIT (haut) ET LE SÉRUM (bas) de la truie 5215, APRÈS VACCINATION ORALE avant la mise bas, avec la souche 188-SG et infection virulente des porcelets à la mamelle. Anticorps neutralisants (O-O), Anticorps IgA détectés par la réaction ELISA (●-●), Anticorps IgG détectés par la réaction ELISA (▲-▲).

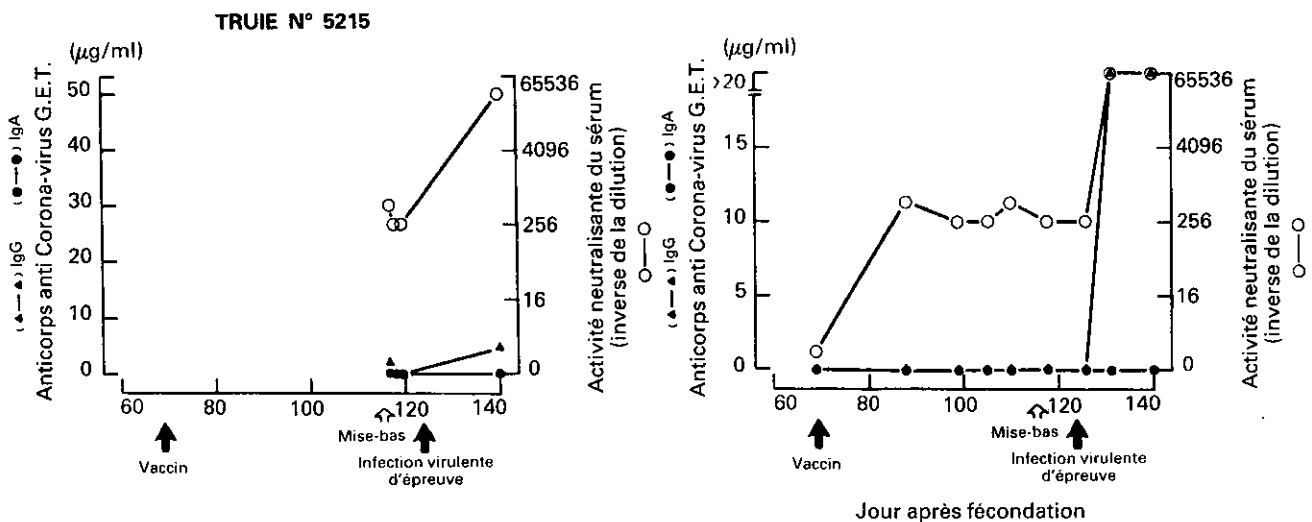
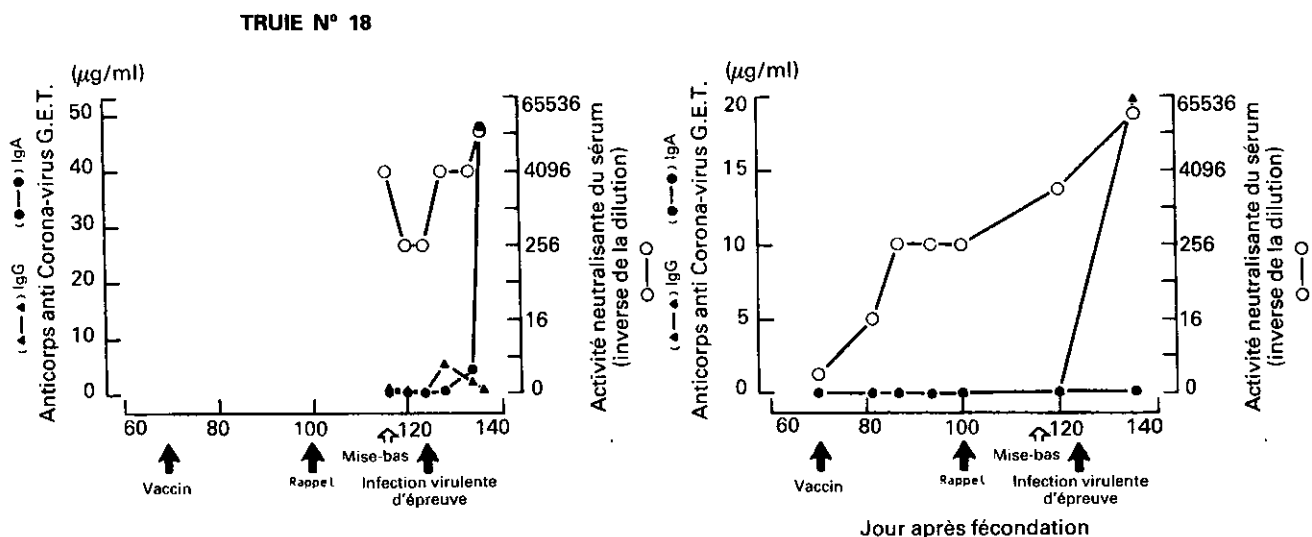


FIGURE 4

CINÉTIQUE D'APPARITION DES ANTICORPS DANS LE LAIT (haut) ET LE SÉRUM (bas) de la truie 18, APRÈS VACCINATION ORALE avant la mise bas, avec la souche 188-SG, rappel intra-musculaire, et infection virulente d'épreuve des porcelets à la mamelle. Anticorps neutralisants (O-O), Anticorps IgA détectés par la réaction ELISA (●-●), Anticorps IgG détectés par la réaction ELISA (▲-▲).



DISCUSSION DES RÉSULTATS

1) RECHERCHE DES ANTIGÈNES GET

La technique « sandwich » ELISA, dans les conditions où nous l'avons décrite, permet la détection des antigènes anti-*corona* virus de la gastro-entérite transmissible. Jusqu'à présent cette technique utilisée pour la détection de nombreux agents infectieux n'avait pas encore été décrite pour le GET. La sensibilité maximum de cette réaction a été obtenue en utilisant à la fois des anticorps monoclonaux, fixés au fond de la plaque qui permettent une bonne spécificité de la détection, et un anticorps polyclonal de truie marqué à la peroxydase avec une activité spécifique élevée.

La spécificité de la réaction a été vérifiée vis-à-vis de différents autres agents entéropathogènes, *rotavirus* porcin, DEP (diarrhée épidémique porcine), et différents *E. Coli* entéritiques de sérotypes variés. Les réactions croisées sont aux environs de 0,1 avec ces agents contre 0,8 pour la souche PURDUE de référence.

La sensibilité de la technique est bonne puisqu'il est possible de détecter 10^4 UFP/cupule, soit par 100 μ l. Par ailleurs, la limite de détection de virus PURDUE-115 hautement purifié, se situe aux environs de 15 ng/ml de virus (résultats non publiés).

Nous avons, avec cette méthode, un moyen facile, spécifique, et dont la sensibilité, moindre de celle utilisant l'effet cytopathogène en culture cellulaire *in vitro*, permet par contre la mise en évidence de souche sauvage du terrain, difficile à cultiver à partir des milieux très contaminés comme les fécès.

2) DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-GET

L'utilisation de la technique ELISA pour les détections des anticorps, s'est révélée moins sensible que nous l'aurions espéré. NELSON et KELLING, en utilisant du virus purifié pour couvrir le fond des cupules, décrivent une technique plus sensible que la séroneutralisation. Pourtant les titres neutralisants de sérum d'animaux infectés par le *coronavirus*, publiés par cette équipe, nous semblent relativement faibles par rapport à ceux que nous observons, lors d'infections expérimentales. Il est néanmoins possible que l'utilisation d'une technique indirecte pour accrocher le virus sur la plaque, compte tenu de la structure particulière de ce *coronavirus*, entraîne une perte de sensibilité pour la détection des anticorps. Cette façon de procéder offre par contre l'énorme avantage de pouvoir utiliser des surnageants de virus brut sans étape de purification, alors que les quantités optimales décrites par ces auteurs, pour couvrir le fond de la plaque, sont de l'ordre de 1 μ g de virus purifié par cupule (0,1 mg/plaque).

Les résultats que nous avons obtenus sur de nombreuses portées (AYNAUD, 1985) sont assez bien illustrés par les cinétiques d'apparition des IgG et IgA anti-GET dans le sérum et le lait montrés figures 3 et 4. Il est encore difficile de relier la protection des porcelets avec le titre en anticorps neutralisants dans le sérum ou le lait de leur mère. Le titrage ELISA des classes d'anticorps aurait pu être une aide à l'explication de ce phénomène. Pourtant, malgré les quelques résultats que nous ayons, nous nous sommes aperçus qu'il faut bien dissocier les anticorps globaux mis en évidence par la technique ELISA et les anticorps neutralisants dirigés contre un site antigénique bien précis de la particule virale. Actuellement, nos efforts ont pour objectif de déterminer si le transfert passif de la protection de la mère vers le porcelet, via le lait, est relié ou non à une classe précise d'anticorps portant l'activité neutralisante.

BIBLIOGRAPHIE

- AYNAUD J.M. *et al.*, 1984 a. Journées Rech. Porcine en France, **16**, 241-246.
- AYNAUD J.M., BOTTREAU E., 1984 b. Ann. Rech. Vet., **15**, 359-364.
- AYNAUD J.M. *et al.*, 1985. Journées Rech. Porcine en France, **17**, 203-210.
- AYNAUD J.M. *et al.*, 1985. J. Gen. Virol., **66**, 1911-1917.
- BERNARD S., LANTIER I., 1985. J. Immunol. Method. **83**, 97-100.
- BOHL E.H., CROSS R.F., 1971. Ann. NY Acad. Sci., **176**, 150-161.
- BOHL E.H., 1981. In : H.W. Dunne, Diseases of swine, 195-208, Iowa State University Press Ed., Ames, U.S.A.
- DULAC G.C. *et al.*, 1977. Can. J. Comp. Med., **41**, 357-363.
- FLEWETT T.H., 1978. J. Am. Vet. Med. Assoc., **173**, 538-543.
- KODAMA Y. *et al.*, 1980. Am. J. Vet. Res., **41**, 133-135.
- LAUDE H., SAVEY M., 1979. Le Point Vétérinaire, **9**, 47-56.
- LAUDE H. *et al.*, 1981. Am. J. Vet. Res., **42**, 447-449.
- NELSON L.D. et KELLING C.L., 1984. Am. J. Vet. Res., **45**, 1654-1657.
- SHIMIZU M. et SHIMIZU Y., 1977. J. Clin. Microbiol., **6**, 91-95.
- VANNIER Ph. *et al.*, 1977. Rec. Med. Vet., **153**, 103-108.