

# MISE AU POINT D'UN TEST ÉLISA PERMETTANT DE DIFFÉRENCIER LES ANIMAUX VACCINÉS DES ANIMAUX INFECTÉS PAR LA VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY

ELOIT M. (1), FARGEAUD D. (2), VANNIER P. (3), TOMA B. (1)

(1) Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Chaire des Maladies contagieuses, 7, avenue du Général de Gaulle, 94704 MAISONS-ALFORT Cédex

(2) Rhône Mérieux, IFFA Mérieux, 254 rue Marcel Mérieux, 69007 LYON

(3) Ministère de l'Agriculture, Station de Pathologie Porcine, BP 9, 22440 PLOUFRAGAN

## I. INTRODUCTION

La maladie d'Aujeszky occupe depuis plusieurs années une place prépondérante dans la pathologie infectieuse porcine à travers le monde. Sur le plan clinique, elle se traduit par une mortalité importante chez les porcelets alors que les porcs adultes développent généralement une infection latente asymptomatique. De nombreuses autres espèces animales sont également sensibles à la maladie (herbivores, carnivores, rongeurs) sous la forme d'encéphalite d'évolution mortelle en 18 à 24 heures et ne développent jamais d'infection latente. La lutte contre cette maladie passe par des mesures de vaccination des porcs dans les zones très infectées ou par des plans d'abattage des porcs infectés en régions à faible taux d'infection. Jusqu'à présent, l'absence de test sérologique permettant de différencier les porcs infectés des porcs vaccinés a gêné considérablement l'élaboration de plans de lutte mixtes associant une vaccination des porcs à des mesures d'abattage sélectif des animaux infectés. Or, depuis deux ans des éléments d'information nouveaux sur la structure du virus de la maladie d'Aujeszky (PRV) ont permis de montrer que certaines souches vaccinales vivantes, utilisées depuis de nombreuses années, étaient déletées pour certaines glycoprotéines. Ainsi les souches Bartha et NIA4 n'expriment ni GI ni gp63 et la souche Norden ne synthétise pas GI (Ben Porat *et coll.*, 1986 ; Mettenleiter *et coll.*, 1985 ; Petrovskis *et coll.*, 1986).

La vaccination de porcs à l'aide d'une de ces souches n'entraîne donc pas de réponse sérologique contre GI, contrairement à l'infection de porcs par une souche pathogène synthétisant GI. L'existence d'anticorps dirigés contre GI témoigne donc de l'infection de l'animal. Nous avons développé une technique ELISA par compétition permettant de doser l'inhibition de la fixation d'un anticorps monoclonal anti GI sur l'antigène par un sérum à tester. Chaque sérum est étudié parallèlement en compétition contre un anticorps monoclonal anti GI qui reconnaît toutes les souches, vaccinales ou virulentes, que nous avons étudiées jusqu'à présent (résultats non présentés). Nous montrons dans ce rapport que l'analyse comparée de la réponse sérologique d'un porc contre GI et GIll permet dans la plupart des cas de classer l'animal dans une des trois catégories : absence d'anticorps dirigés contre le PRV ; présence d'anticorps d'origine vaccinale ; présence

d'anticorps résultant d'une infection par une souche virulente de PRV.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. ANTICORPS MONOCLONAUX

Un anticorps monoclonal dirigé contre GI (42M17) et un anticorps monoclonal dirigé contre GIll (6P19) ont été utilisés. Leur isolement et leur caractérisation seront décrits ultérieurement (manuscrit en préparation).

### 2.2. VIRUS ET CELLULES

La souche Kojnok virulente est entretenue sur lignée PK15 (Pig Kidney) et la souche virulente S75V19 sur cellules secondaires de rein de porcs cultivées en milieu essentiel minimum de Eagle avec sels de Earle (Laboratoires Eurobio) additionné de 100 UI/ml de pénicilline, de 100 UI/ml de polymyxine et de 10 % de sérum de veau nouveau-né (laboratoires Flow).

### 2.3. VACCINS

Le vaccin SUVAXYN FLU AUJESZKY (laboratoire Salsbury) utilisant la souche Bartha (Bartha 1961), le vaccin AUSKIMMUNE K (laboratoire Smith Kline) composé de la souche Norden inactivée et adjuvée, et la souche NIA4, non virulente pour le porc, décrite par Lamont et Mac Ferran (1974), ont été utilisés.

### 2.4. TECHNIQUE ELISA

#### 2.4.1. Antigène

La souche Kojnok est inoculée à des cellules PK15 trypsinées 24 heures auparavant à raison de 5 TCID50 par cellule,

laissée en contact une heure à 37°C puis l'inoculum est éliminé et remplacé par le milieu de culture des cellules, sans sérum de veau foetal. Après 24 heures environ, lorsque l'effet cythopathogène est suffisamment développé, le virus est concentré par ultracentrifugation (rotor SW 27, 25.000 t/mn, une heure) et le culot est repris en tampon Tris 0,05 M NaCl 0,1 M pH 7,4. Le virus est purifié par sédimentation dans un gradient linéaire inverse de tartrate de potassium et de glycérol (tartrate de potassium 15 % p/p ; glycérol 30 % p/p / tartrate de potassium 15 % p/p) en tampon Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M pH 7,4 durant une heure à 25.000 t/mn (rotor SW 27). La bande virale est alors récoltée et concentrée (rotor SW 27, 25.000 t/mn, une heure) et le culot est repris en eau distillée. Les protéines d'enveloppe sont solubilisées par le Triton X 100 (1 % v/v) pendant 1/2 h à 37°C puis clarifiées pendant une heure dans une centrifugeuse Eppendorf.

#### 2.4.2 Protocole

Les cupules de plaques pour test ELISA (Dynatech, M129B) sont sensibilisées par 200 µl par cupule d'antigène dilué en tampon Tris 0,1 M pH 9,6 EDTA 2mM NaCl 0,15 M pendant une nuit à + 4°C, puis lavées trois fois en eau distillée additionnée de 0,08 % Tween 20. Les sites libres sont saturés pendant 30 mn à 37°C par le tampon Tris 0,1 M pH 9,6 EDTA 10 mM BSA 3 %. Après trois lavages les sérums à étudier sont dilués au demi en tampon de dilution PBS Tween 20 0,05 % BSA 3 % puis déposés en double exemplaire sous 200 µl et incubés pendant une heure à 37°C. Après trois lavages, 200 µl d'un anticorps monoclonal anti GI (42M17) ou anti GIII (6P19) sont déposés dans chacune des cupules contenant le sérum à tester après dilution en tampon de dilution, incubés pendant 30 mn à 37°C puis les plaques sont lavées trois fois. L'accrochage des immunoglobulines de souris est révélé par addition d'un sérum anti IgG de souris marqué par la biotine (BRL) dilué en tampon PBS Tween 20 0,05 % additionné de 10 % de sérum de porc négatif et incubé pendant 30 mn à 37°C. Après trois lavages, 200 µl par cupule du conjugué streptavidine-peroxydase (BRL) dilué en tampon PBS Tween 20 0,05 % BSA 1 % sont ajoutés et incubés pendant 30 mn à 37°C. La réaction est révélée par l'addition de 200 µl par cupule de solution substrat (tampon citrate 25 mM phosphate 16 mM pH 5, orthophénylène diamine 5,5 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11 mM) et arrêtée après 1/4 d'heure à température ambiante et à l'obscurité par 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La densité optique de chaque cupule est lue à 492 nm. Un sérum de porc SPF (V 85) est utilisé comme témoin négatif sur chaque plaque. Pour chaque sérum le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule :

$$I = \left(1 - \frac{DO \text{ sérum}}{DO \text{ V85}}\right) \times 100$$

vis-à-vis de l'anticorps monoclonal anti GI et vis-à-vis de l'anticorps monoclonal anti GIII.

#### 2.4.3. Interprétation

Des expériences préliminaires nous ont conduit à considérer qu'un porc présentait une sérologie positive si l'inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal anti GIII était supérieure ou égale à 30 %. L'interprétation concernant l'origine des anticorps ne peut s'effectuer que pour des réponses anti GIII supérieures ou égales à 60 % de manière à tenir compte de la différence de sensibilité entre les deux techniques. Dans ce cas, une réponse anti GI inférieure à 30 % permet de conclure à la vaccination de l'animal alors qu'une réponse anti GI supérieure à 40 % permet de déclarer l'animal infecté. Une réponse anti GI comprise entre 30 et 40 % ne permet pas de conclure sur l'origine des anticorps mis en évidence.

## 2.5. SERUMS

Plusieurs protocoles de vaccination avec ou sans épreuve virulente ont été réalisés.

### 2.5.1. Expérience 1 :

Quatre porcs de 4 à 5 mois ont été vaccinés par une injection de vaccin Suvaxyn Flu 3 à J0 puis ont reçu 10<sup>6,9</sup> TCID50 de la souche virulente S75V19 par voie intranasale à J27. Deux porcs témoins n'ont pas été vaccinés mais ont reçu le virus d'épreuve à la même date que les porcs vaccinés. Des prises de sang ont été réalisées à J0, J27, J35 et J48.

### 2.5.2. Expérience 2 :

Deux truies ont été vaccinées par deux injections de vaccin Auskimmune réalisées à J0 et J21. Des prises de sang ont été réalisées à J0, J15, J28 et J49 chez ces truies. Leurs porcelets ont également fait l'objet d'un contrôle sérologique à l'âge de 7 jours. Parallèlement une truie témoin non vaccinée et ses porcelets nés le même jour ont fait l'objet du même protocole.

### 2.5.3. Expérience 3 :

Cinq porcelets d'un mois, nés d'une truie vaccinée par le vaccin Auskimmune K, ont fait l'objet d'une vaccination à J0 par 10<sup>7</sup> TCID50 de la souche NIA4 instillée par voie nasale. Ces porcelets ont reçu à J60 10<sup>7,7</sup> TCID50 de la souche virulente S75V19 par voie nasale. Des prises de sang ont été réalisées à J-30, J-24, J-17, J-10, J0, J17, J24, J53, J60, J67 et J74.

### 2.5.4. Expérience 4 :

Cinq porcelets de 12 jours ont été vaccinés à J0 par 10<sup>8</sup> TCID50 de la souche NIA4 par voie intranasale plus 10<sup>8</sup> TCID50 de la même souche par la voie intramusculaire. Trois porcs en contact avec ces animaux n'ont pas été vaccinés. Les prises de sang ont été réalisées à J0, J7, J14 et J22.

## 3. RESULTATS

### 3.1.1. Expérience 1 (tableau 1)

Le jour de la vaccination (J0) six porcs présentaient une sérologie négative. Un mois plus tard (J27), le jour de l'épreuve virulente, les quatre porcs vaccinés fournissaient une réponse positive contre GIII (64 à 95 % d'inhibition) et négative contre GI (12 à 23 % d'inhibition). La réponse contre GI a été détectée à J48, soit trois semaines après l'épreuve virulente.

Il est intéressant de souligner que, chez les porcs non vaccinés, la réponse anti GI a été comparable à celle des animaux vaccinés alors que la réponse anti GIII s'est révélée moins intense que chez ces derniers, sans doute en raison de l'absence d'effet rappel contre cette protéine lors de l'épreuve virulente. Il est donc apparu que, un mois après vaccination, tous les animaux présentaient une sérologie positive dont l'origine vaccinale a pu être identifiée et que, trois semaines après l'épreuve, tous les animaux, vaccinés ou non, montraient une sérologie positive identifiable comme d'origine post infectieuse.



### 3.1.2. Expérience 2 (tableau 2, p. 143)

Les deux truies vaccinées ont présenté une sérologie positive d'origine vaccinale au plus tard une semaine après la seconde injection de vaccin. Les sérums de leurs 22 porcelets de 8 jours ont tous montré une réponse anti GIII comprise entre 70 et 87 % d'inhibition. Dans 17 cas sur 22, une réponse anti GI inférieure à 30 % a permis de reconnaître la présence d'anticorps d'origine vaccinale hérités de la buvée colostrale. Dans quatre cas sur 22, il a été impossible de conclure sur l'origine des anticorps en raison d'une réponse anti GI comprise entre 30 et 34 %. La truie non vaccinée et les porcelets ont dans tous les cas fourni une réponse négative contre les deux glycoprotéines.

### 3.1.3. Expérience 3 (tableau 3 et figure 1)

Les cinq porcelets ont fourni une réponse positive contre GIII jusqu'au jour de la vaccination, à l'âge d'un mois. Cette

sérologie positive a pu être rattachée pour une partie d'entre eux, à la présence d'anticorps post vaccinaux d'origine maternelle, au plus tard jusqu'à l'âge de trois semaines. A l'âge d'un mois, le jour de la vaccination (J0), la réponse anti GIII, bien que positive, était trop faible (< 60 %) pour qu'il soit possible de conclure sur l'origine des anticorps présents sur la base de la réponse anti GI. 24 jours après la vaccination, la présence d'anticorps post vaccinaux a pu être mise en évidence chez trois porcs sur cinq, puis chez tous les porcs lors de la prise de sang réalisée un mois plus tard. Une semaine après l'épreuve virulente quatre porcs sur cinq étaient repérés infectés et deux semaines après cette épreuve virulente, le cinquième porc infecté était également repéré.

### 3.1.4. Expérience 4 (tableau 4)

Les cinq porcelets de 12 jours vaccinés à J0 par 5 doses de la souche NIA4 par voie intranasale et 5 doses par voie

TABLEAU 3

#### EXPÉRIENCE 3 : IMMUNITÉ PASSIVE, VACCINATION ET ÉPREUVE VIRULENTE

Cinq porcelets d'un mois, nés d'une truie vaccinée par le vaccin AUSKIMMUNE K, ont fait l'objet d'une vaccination à J0 par 10<sup>7</sup> TCID50 de la souche NIA4 instillée par voie nasale puis ont reçu, à J60, 10<sup>7,7</sup> TCID50 de la souche virulente S75V19 par la voie intranasale.

PORC	J-30					J-24					J-17					J-10					
	GIII	GI	Résultat	Origine	SN	GIII	GI	Résultat	Origine	SN	GIII	GI	Résultat	Origine	SN	GIII	GI	Résultat	Origine	SN	
703	75	21	+	V	+4	66	11	+	V	+4	67	23	+	V	+4	58	24	+	Oconcl	—	
705	75	23	+	V	+2	68	20	+	V	+2	67	24	+	V	+4	60	11	+	V	+2	
707	29	0	dbt		+4	63	21	+	V	+2	61	30	+	VI	+2	54	19	+	Oconcl	—	
712	75	30	+	VI	+8	75	31	+	VI	+4	66	29	+	V	+2	63	26	+	V	+2	
713	73	25	+	V	+4	71	23	+	V	+4	62	27	+	V	+4	65	30	+	VI	+2	
	J0					J17					J24					J53					
703	45	21	+	Oconcl	+2	50	17	+	Oconcl	+8	74	17	+	V	+8	96	30	+	VI	+16	
705	52	10	+	»	+2	56	22	+	»	+2	59	12	+	Oconcl	+2	95	29	+	V	+8	
707	46	16	+	»	—	54	18	+	»	+2	65	16	+	V	+4	95	23	+	V	+16	
712	54	18	+	»	+2	52	22	+	»	+4	56	10	+	Oconcl	+4	86	17	+	V	+16	
713	56	27	+	»	+2	44	19	+	»	+4	62	11	+	V	+4	92	23	+	V	+16	
	J60					J67					J74										
703	97	36	+	VI	+16	97	41	+	I	+128	98	59	+	I	+512						
705	96	29	+	V	+4	98	38	+	VI	+64	97	66	+	I	+256						
707	96	30	+	VI	+32	97	47	+	I	+256	98	67	+	I	+512						
712	88	36	+	VI	+8	97	44	+	I	+256	98	59	+	I	+512						
713	91	18	+	V	+16	96	48	+	I	+128	97	62	+	I	+512						

Même légende que le tableau 1.

TABLEAU 4

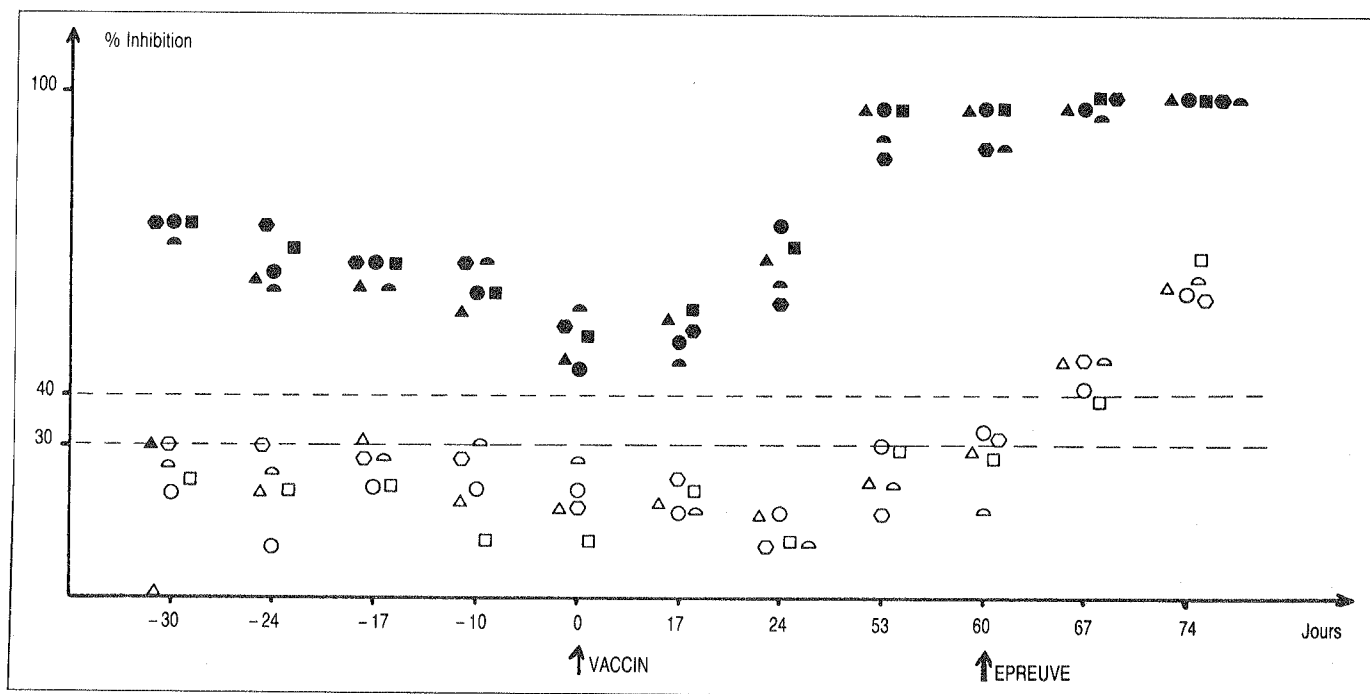
#### EXPÉRIENCE 4 :

Cinq porcelets de 12 jours (n° 1266, 1267, 1269, 1270 et 1271) ont été vaccinés à J0 par 10<sup>8</sup> TCID50 de la souche NIA4 par voie intranasale plus 10<sup>8</sup> TCID50 de la même souche par la voie intramusculaire. Trois porcs (n° 1265, 1268 et 1272) en contact avec ces animaux n'ont pas été vaccinés.

PORC	J0					J7					J14					J22				
	GIII	GI	Résultat	Origine	SN	GIII	GI	Résultat	Origine	SN	GIII	GI	Résultat	Origine	SN	GIII	GI	Résultat	Origine	SN
1266	0	0	—		—	0	6	—		—	24	13	—		+2	82	28	+	V	+4
1267	0	0	—		—	0	1	—		—	18	13	—		+2	56	23	+	Oconcl	+4
1269	10	14	—		—	0	11	—		—	25	11	—		+4	78	26	+	V	+4
1270	14	19	—		—	12	19	—		—	33	16	—	Oconcl	+2	71	23	+	V	+4
1271	19	10	—		—	0	13	—	dbt	—	25	10	—		+2	78	13	+	V	+2
1265	4	1	—		—	0	18	—		—	0	3	—		—	10	10	—		—
1268	6	9	—		—	1	8	—		—	11	12	—		—	15	18	—		—
1272	14	26	—		—	0	15	—		—	ND	ND	—		—	ND	ND	—		—

Même légende que le tableau 1.

FIGURE 1  
PORCELETS ISSUS DE TRUIES VACCINÉES SOUCHE NORDEN  
VACCINATION NIA4 VOIE INTRANASALE



intramusculaire ont développé une réponse anti GIII positive 2 à 3 semaines après la vaccination alors que la réponse anti GI est toujours restée négative. L'interprétation des résultats a conduit à considérer comme vaccinés 4 porcs sur 5, trois semaines après la vaccination et ne pas pouvoir conclure sur l'origine de la réponse positive anti GIII du cinquième porc en raison du faible niveau de celle-ci. Par ailleurs tous les porcs témoins en contact avec les animaux vaccinés ont constamment présenté une réponse anti GIII négative.

#### 4. DISCUSSION

La mise en évidence de l'existence de souches vaccinales ne synthétisant pas la glycoprotéine GI (Ben Porat *et coll.*, 1985 ; Mettenleiter *et coll.*, 1985 ; Petrovskis *et coll.*, 1986) a ouvert la voie à la mise au point de techniques sérologiques permettant potentiellement de différencier les animaux vaccinés par une de ces souches des animaux infectés. Van Oirschot *et coll.* (1986) ont pu montrer, à l'aide d'une technique ELISA par compétition utilisant un tapis cellulaire infecté comme antigène et un anticorps monoclonal anti GI, que la réponse anti GI chez un porc infecté pouvait effectivement servir comme marqueur de l'état d'infection de l'animal : la technique développée ne permet néanmoins pas de faire la différence entre les animaux ne possédant pas d'anticorps contre le PRV et les animaux vaccinés par une souche GI-. Nous avons pour notre part développé une technique permettant de faire la différence entre les animaux vaccinés, infectés ou ne possédant pas d'anticorps, grâce à l'utilisation de deux anticorps monoclonaux anti GIII et anti GI.

Les animaux vaccinés par une souche GI- fournissent généralement un taux d'inhibition pour l'anticorps monoclonal anti GI inférieur à 30 % et parfois compris entre 30 et 40 % (expériences 1 à 4). L'existence de cette inhibition peut sans doute

être expliquée par la fixation des anticorps de porc sur d'autres protéines de l'antigène créant une gêne stérique pour la fixation de l'anticorps monoclonal sur la protéine GI. Chez des porcs hyperimmuns, vaccinés toutes les deux semaines pendant 4 mois par la souche NIA4, cette inhibition variait entre 39 et 45 % (résultats non présentés). La réponse anti GIII chez des animaux vaccinés par une souche GI- atteint une valeur supérieure à 60 % un mois après l'unique injection de vaccination à l'aide de vaccins à virus vivant modifié ou une semaine après la seconde injection de vaccin à virus inactivé (Auskimmune K, expérience 2), alors que la réponse anti GI reste inférieure à 30 %, permettant ainsi de conclure à la présence d'anticorps d'origine vaccinale. Ces résultats sont très proches de ceux obtenus pour la souche vaccinale vivante NIA4 où l'examen des sérums prélevés trois semaines après l'injection unique de vaccin a montré que 4/5 porcs présentaient une réponse anti GIII supérieure à 60 % associée à une réponse anti GI inférieure à 30 %, malgré l'utilisation de 10 doses vaccinales utilisées pour vacciner les porcs. Les réponses enregistrées 3 semaines après l'utilisation de cette souche par voie intranasale chez des porcs de un mois possédant des résidus d'anticorps d'origine colostrale sont également parfaitement superposables (expérience 3). Parallèlement, nous avons pu montrer que 18 sur 22 porcelets de 8 jours issus de mère vaccinée par une souche GI- (Auskimmune K, expérience 2) fournissaient une réponse comparable alors que 4 autres porcelets présentaient une réponse anti GI comprise entre 30 et 34 % ne permettant pas de conclure sur l'origine des anticorps mis en évidence.

Chez des porcs vaccinés par une souche GI- puis éprouvés, la réponse anti GI est devenue positive (> 40 %) deux semaines (expérience 3) ou trois semaines (expérience 1) après l'épreuve virulente, permettant sans ambiguïté de repérer comme infectés de tels animaux.

L'utilisation de la réponse anti GI comme marqueur de l'infection chez le porc nécessite de connaître l'évolution de cette

réponse dans le temps et nous manquons encore de recul pour apprécier cette évolution. Nous avons néanmoins étudié 48 sérums de porcs infectés à une date inconnue provenant d'élevages atteints par le virus de la maladie d'Aujeszky. Tous les animaux présentant un titre en anticorps supérieur au niveau du sérum C.E.E. ont donné une réponse contre GI supérieure à 30 % d'inhibition (résultats non présentés). Ces résultats devront à l'avenir être complétés par l'étude de sérums correspondant à des porcs infectés depuis un temps connu.

Par ailleurs, il peut exister certaines souches sauvages qui n'expriment pas, ou qui expriment sous une forme immature la glycoprotéine GI (Mettenleiter *et coll.*, 1987) et qui possèdent ainsi un phénotype de souche vaccinale. En l'absence d'information sur le pouvoir pathogène de telles souches, les conséquences d'une infection d'un cheptel par ce type de souche peuvent difficilement être évaluées.

La technique décrite nous paraît donc potentiellement utilisable pour repérer les élevages infectés sous couvert de la vaccination et pour éliminer à l'intérieur de ceux-ci les animaux infectés. Nous étudions actuellement l'utilisation d'une telle technique dans le cadre d'élevages vaccinés et infectés.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions :

- Mme Martine ANDRIAMANGA pour son excellente collaboration technique. Travail supporté par une aide financière de la Société Rhône Mérieux (Lyon, France).
- les sociétés Salsburg et Smithkline pour la prise en charge d'une partie de la production des sérums.

## BIBLIOGRAPHIE

- BARTHA A., 1961. *Magy. Allatorv. Lapja.*, **16**, 42-45.
- BEN PORAT T., DEMARCHI J., PENDRYS J., VEACH R.A., KAPLAN A.S., 1986. *J. Virol.*, **57**, (1), 191-196.
- LAMONT P.H., MAC FERRAN J.B., 1974. *Cah. Med. Vét.*, **43**, 270-273.
- METTENLEITER T.C., LUKACS N., RZIHA H.J., 1985. *J. Virol.*, **56**, (1), 307-311.
- METTENLEITER T.C., SCHREURS C., THIEL H.J., RZIHA H.J., 1987. *Virol.*, **158**, 141-146.
- PETROVSKIS E.A., TIMMINS J.G., GIEMAN T.M., POST L.E., 1986. *J. Virol.*, **60**, (3), 1166-1169.
- VAN OIRSCHOT J.T., RZIHA H.J., MOONEN P.L.J., POL J.M.A., VAN ZAANE D., 1986. *J. Gen. Virol.*, 1986, **67**, 1179-1182.