

Utilisation d'extraits musculaires pour la détection des anticorps anti-gE du virus de la maladie d'Aujeszky

Marie-Frédérique LE POTIER (1), A. FOURNIER (2), Catherine HOUDAYER (1), Évelyne HUTET (1),
V. AUVIGNE (3), D. HERY (3), M. SANAA (2), B. TOMA (2)

(1) C.N.E.V.A., Unité de Virologie et d'Immunologie Porcine - Zoopôle, Les Croix - BP53, 22440 Ploufragan

(2) École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Laboratoire OIE de référence de la maladie d'Aujeszky LEGSA
7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex

(3) U.G.P.V.B. -104 rue Eugène Pottier, BP 6613, 35066 Rennes Cedex

Utilisation d'extraits musculaires pour la détection des anticorps anti gE du virus de la maladie d'Aujeszky

Un test ELISA commercial pour la détection des anticorps sériques anti-gE du virus de la maladie d'Aujeszky a été adapté à l'utilisation d'extraits musculaires. Ces échantillons sont récupérés à partir de morceau de muscle du diaphragme prélevés sur la carcasse à l'abattoir. 389 couples (sérum/extrait musculaire) ont été étudiés de façon comparative pour déterminer la possibilité d'utiliser les extraits musculaires comme échantillon dans un programme de contrôle de la maladie d'Aujeszky. En prenant le sérum comme référence, la sensibilité individuelle du test était de 93,2% et la spécificité individuelle de 98,3%. La concentration en anticorps dans les extraits musculaires est en moyenne vingt fois inférieure à celle des sérums et peut expliquer un léger manque de sensibilité en diagnostic individuel. Les résultats obtenus tant en sensibilité qu'en spécificité seraient toutefois compatibles avec un suivi sérologique d'un plan de prophylaxie de la maladie d'Aujeszky à l'échelle du troupeau.

Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to detect antibodies to glycoprotein gE of pseudorabies virus in muscle exsudate.

A commercial ELISA test to detect serum anti-gE antibodies for the Aujeszky virus has been adapted for use with muscle exsudates. The samples tested were collected from a piece of diaphragm muscle taken from the carcass at the slaughterhouse. Three hundred and eighty-nine pairs of samples (serum/muscle exsudate) were studied comparatively to determine the possibility of using muscle exsudate samples in a programme to control Aujeszky's disease. Taking the serum samples as the reference, the individual sensitivity of the test was 93.2% and the individual specificity was 98.3%. The concentration of antibodies in the muscle exsudates was on average twenty times lower than that of the serum samples and can explain the slight loss of sensitivity when used as an individual diagnosis. The results obtained concerning sensitivity and specificity could be nevertheless compatible with the serological follow-up of a prophylactic plan used to control Aujeszky's disease in herds.

INTRODUCTION

De nombreux pays tentent d'éradiquer le virus de la maladie d'Aujeszky et la vaccination peut être très utile dans les programmes d'éradication et de contrôle pour diminuer l'incidence de l'infection. L'utilisation de vaccins déléétés pour la glycoprotéine gE et de techniques de dépistage sérologique permettant de distinguer les anticorps d'origine infectieuse des anticorps d'origine vaccinale, offre des outils pour contrôler l'efficacité des plans de prophylaxie mis en oeuvre. Plusieurs études ont été réalisées tant en France qu'à l'étranger sur la sérologie différentielle de la maladie d'Aujeszky sur sérums individuels ou en mélange, sur buvards et sur colostrum (BOUWKAMP et al, 1993, ÉLOIT et al, 1989). Plus récemment, une équipe danoise a développé une technique ELISA utilisant les carcasses de porcs pour rechercher des anticorps anti-salmonelles (NIELSEN et al, 1996). Cette méthode, dont la sensibilité est semblable à celle de la technique sur sérum, donne satisfaction dans la mise en place du plan national danois de contrôle des salmonelles.

La récolte à l'abattoir de prélèvements pour le dépistage sérologique présente de sérieux avantages dans la conduite d'un plan de prophylaxie, en permettant d'éviter des manipulations d'animaux vivants en élevage. Cependant la prise de sang à l'abattoir se heurte à deux problèmes principaux, l'identification de l'animal au moment de la saignée et un problème de sécurité pour le préleveur à ce stade, alors qu'un prélèvement sur la carcasse peut être réalisé sur la chaîne d'abattage à un moment où elle est clairement identifiée. En adaptant un test ELISA à la détection des anticorps anti-gE sur extrait de muscle, notre objectif était d'évaluer la possibilité d'utiliser les prélèvements sur carcasses à l'abattoir pour le suivi sérologique d'un plan de prophylaxie de la maladie d'Aujeszky, au sein notamment d'une population de porcs vaccinés.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Mise au point de la méthode

Une expérience préliminaire a permis de déterminer le choix du site de prélèvement sur la carcasse, ainsi que le protocole à utiliser pour traiter les extraits musculaires en ELISA.

Les quatre impératifs qui ont dicté le choix du site de prélèvement étaient

- 1) la facilité de prélèvement,
- 2) l'absence d'atteinte de la valeur marchande de la carcasse,
- 3) la possibilité d'automatisation sur la chaîne d'abattage et
- 4) la qualité d'exsudation du morceau prélevé.

Sur une quarantaine de porcs, tout ou partie des prélèvements suivants ont été réalisés : un tube de sang, un morceau de diaphragme, un morceau de muscle du cou, un ganglion inguinal, un cube de tissu rénal (cortex), un morceau de glandes salivaires. Tous les prélèvements de tissus ont été congelés dans les quatre heures suivant la collecte. Les échantillons de tissu ont ensuite été décongelés lentement et le pourcentage de jus exsudé a été évalué. Le volume d'exsudat récolté à la décongélation variait beaucoup selon

les tissus. Seul le muscle exsudait de façon constante, les autres organes de manière plus inconstante: 6% des reins, 77% des ganglions, et 100% des glandes salivaires n'ont pas donné d'exsudat à la décongélation. Le poids d'exsudat recueilli variait de façon très importante en fonction des tissus musculaires. Le diaphragme permettant de recueillir un volume d'exsudat toujours compatible avec la réalisation des analyses a été retenu comme muscle à prélever pour la suite des analyses. De plus, les morceaux de diaphragme devaient être prélevés sur la chaîne d'abattage avant le froid choc, ce dernier réduisait en effet l'exsudation de l'extrait musculaire.

1.1.1. Traitement du prélèvement avant analyse

Le sang était centrifugé et le sérum conservé à -20°C en attente de l'analyse. Les morceaux de diaphragme étaient lacérés puis déposés dans des piluliers pour subir une congélation à -65°C. L'extrait musculaire était recueilli après décongélation lente (2 heures à température ambiante suivie d'une nuit à 4°C), transféré en tubes et conservé à -20°C en attente d'analyse.

1.1.2. Technique ELISA

Les extraits musculaires et les sérums étaient analysés simultanément avec une trousse ELISA commercialisée (SVANOVA-LSI). Les résultats obtenus étaient exprimés en pourcentage d'inhibition (% IDO) calculé par rapport à un sérum négatif et interprétés selon les recommandations du fournisseur :

- <40% : positif
- 40% à 50% : douteux
- >50% : négatif

Les sérums et les extraits musculaires ont été analysés après dilution au demi et incubation d'une heure à 37°C, des essais préliminaires portant sur une première série de 188 couples de prélèvements ayant montré que cette durée d'incubation était préférable à celle d'une nuit à température ambiante. De même, la dilution au demi des extraits musculaires permettait de limiter les risques de réactions aspécifiques liées à la nature de l'échantillon.

Pour comparer la concentration en anticorps anti-gE dans le sérum et dans l'extrait musculaire, un titrage simultané de 35 couples (sérum/extrait musculaire) ayant fourni une réponse qualitative positive, parmi les 188 ayant servi à l'étude préalable, a été réalisé sur la même microplaque. La dilution permettant d'atteindre un pourcentage d'inhibition de 40% est considérée comme le titre de l'échantillon.

1.2. Validation de la méthode

Afin d'évaluer la faisabilité de la détection des anticorps anti-gE sur carcasse de porc à des fins de diagnostic, le protocole choisi a été testé sur 389 couples (sérum/extrait musculaire).

Trois cent quatre vingt-neuf animaux, provenant de douze élevages différents pratiquant une vaccination avec un vaccin déléété pour la glycoprotéine gE ont été soumis à prélève-

ments. Les 9 élevages négatifs et les 3 positifs en anticorps gE ont été choisis en fonction de résultats obtenus lors des contrôles sérologiques réalisés régulièrement dans ces élevages. Parmi les porcs de ces élevages, les animaux soumis à prélèvement ont été pris au hasard. Sur la chaîne d'abattage, simultanément à la récolte du sang, une boucle à pointeau métallique était posée sur l'oreille de l'animal pour identifier la carcasse. Les morceaux de diaphragme étaient recueillis et mis en sac plastique portant le numéro d'identification de la boucle. Tous les couples ont été étudiés sur un seul lot de kit (n° 64.2058) et chaque couple a été testé sur la même plaque.

Pour chaque couple d'échantillons (sérum/extrait musculaire), les résultats obtenus par ELISA gE ont été comparés, le sérum servant de référence. La sensibilité et la spécificité du test sérologique sur extrait musculaire ont été évaluées comme décrit dans le tableau 1.

Tableau 1 - Méthode de calcul de la sensibilité et de la spécificité du test

		résultats gE dans le sérum		
		positif	négatif*	total
résultats gE dans l'extrait musculaire	positif	a	b	a+b
	négatif*	c	d	c+d
total		a+c	b+d	a+b+c+d

* Les résultats « douteux » ont été assimilés à des résultats « négatifs »
 La sensibilité est définie par : $a/(a+c)$.
 La spécificité est définie par : $d/(b+d)$.
 La concordance globale des résultats correspond à : $(a+d)/(a+b+c+d)$.

Sur 215 des 389 sérums, les anticorps d'origine vaccinale ont été recherchés par ELISA-gB (SVANOVA-LSI). Les anticorps anti-gB ont été recherchés sur huit lots d'animaux pour lesquels aucun anticorps anti-gE n'avait été détecté ni sur sérum, ni sur extrait musculaire et sur les animaux négatifs en anticorps gE provenant d'un élevage infecté (10 animaux positifs en gE sur les 25 testés).

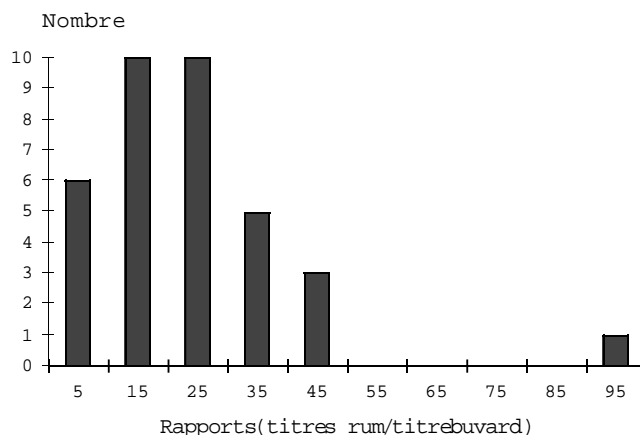
2. RÉSULTATS

2.1. Comparaison des titres ELISA en anticorps anti-gE dans l'extrait musculaire et dans le sérum

La relation entre les titres des sérums et ceux des extraits musculaires a été calculée sous forme d'une droite de régression avec son intervalle de confiance. L'équation de la droite de régression est : Titre (extrait musculaire) = $0,05 \times$ titre (sérum). Pour 20 sur 35 couples d'échantillons étudiés, le sérum contient 10 à 30 fois plus d'anticorps gE que le jus de viande. Le rapport moyen entre les deux titres est de 20, son intervalle de confiance à 95% est de (17,7; 22,9).

La figure 1 indique la distribution des rapports des titres en anticorps des sérums sur les titres en anticorps des extraits musculaires.

Figure 1 - Histogramme de distribution des rapports des titres en anticorps anti-gE dans le sérum et dans les extraits musculaires



2.2. Étude comparative de la détection des anticorps anti-gE dans les extraits musculaires et dans le sérum

La méthode a été validée sur un grand nombre d'animaux (389) en utilisant un seul lot de coffret, ce qui a permis de préciser la spécificité et la sensibilité individuelle de la technique sur extrait musculaire par rapport au sérum considéré comme référence (tableau 2).

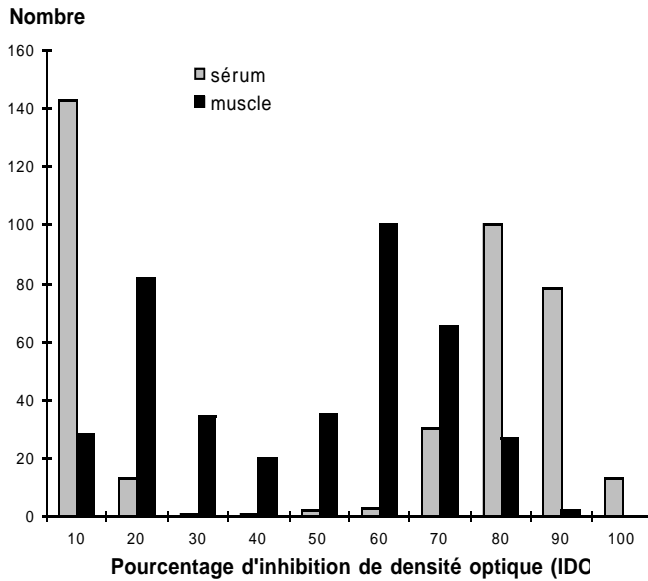
Tableau 2 - Résultats de la détection des anticorps anti-gE dans les échantillons de sérum et d'extrait musculaire de 389 porcs

		sérum			
		gE +	gE +/-	gE -	Total
extrait musculaire	gE +	149	1	4	154
	gE +/-	8	0	12	20
	gE -	3	1	211	215
Total		160	2	227	389

L'étude de la figure 2 (p 402) montre une plus grande fréquence de distribution des pourcentages d'inhibition de densité optique des extraits musculaires vers la moyenne et, au contraire une plus grande dispersion vers les extrêmes pour les sérums. Ceci est particulièrement net pour la zone correspondant aux résultats douteux (40 à 50% de IDO) dans laquelle on n'enregistre qu'un seul sérum mais 20 extraits musculaires.

En assimilant les résultats douteux à des positifs, la sensibilité et la spécificité obtenues respectivement est de 98,1% et 92,95% alors qu'en les assimilant à des résultats négatifs, la sensibilité obtenue est de 93,2 %, et la spécificité de 98,3%, avec un coefficient de concordance de 93,3%

Figure 2 - Histogramme de distribution des pourcentages d'inhibition de densité optique obtenus à partir des 389 paires d'échantillons "sérum/extrait musculaire"



2.3. Étude de la spécificité de la détection des anticorps anti-gE dans les extraits musculaires en présence d'anticorps d'origine vaccinale.

Parmi les animaux négatifs en anticorps gE, 80% possédaient des anticorps anti-gB. Au sein de chaque lot d'animaux, 65 à 100 % des animaux possédaient des anticorps d'origine vaccinale. Il n'existait aucune relation entre la détection des anticorps anti-gB (origine vaccinale) et celle des anticorps anti-gE (origine infectieuse).

3. DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de déterminer si des extraits musculaires pouvaient être utilisés comme échantillon pour détecter les anticorps anti-gE, ce qui serait une méthode de collecte à la fois simple et peu coûteuse, ne nécessitant pas la manipulation d'animaux vivants. Nous avons montré que la technique ELISA de détection des anticorps sériques anti-gE, signant une infection du porc par le virus de la maladie d'Aujeszky, est adaptable à des extraits musculaires. Ces extraits musculaires sont obtenus par congélation/décongélation de morceaux de diaphragme prélevés sur la chaîne d'abattage avant le froid choc.

Avec le coffret commercialisé par SVANOVA (distributeur en France : LSI), l'extrait musculaire à analyser doit être dilué au demi dans la solution tamponnée du coffret pour éliminer les réactions aspécifiques liées vraisemblablement à la richesse en protéines des extraits musculaires. Le protocole d'incubation de l'échantillon est celui utilisé pour le sérum, à savoir 1 heure à 37°C.

Dans ces conditions, trente-cinq couples « sérum/jus de viande » ayant fourni une réponse qualitative positive ont été titrés comparativement sur le même lot de coffret. Il en ressort que les sérums possèdent en moyenne un titre en anticorps anti-gE vingt fois plus élevé que les extraits musculaires correspondants.

Dans cette étude, nous avons noté une différence de distribution des pourcentages d'inhibition de la densité optique entre les sérums et les extraits musculaires. Elle s'explique par une concentration en anticorps plus faible dans les extraits musculaires que dans les sérums, ainsi que par une plus grande richesse en protéines diverses dans les extraits musculaires qui doit, par un phénomène de saturation aspécifique, inhiber davantage l'action du sérum anti-gE utilisé dans le kit. Une modification du seuil de détectabilité n'améliorerait pas la discrimination entre les extraits musculaires et les sérums. Dans ces conditions, les résultats douteux ont été considérés comme négatifs afin de privilégier la spécificité du test. En utilisant le seuil de positivité du coffret ELISA à un pourcentage d'inhibition de 40%, la sensibilité individuelle de la détection des anticorps anti-gE dans les extraits musculaires est en moyenne de 93,2% (avec un intervalle de confiance à 95%, de 88,8% à 96,9%), pour une spécificité individuelle de 98,3% (avec un intervalle de confiance à 95%, de 96,5% à 99,5%). Ces résultats devraient permettre de réaliser un suivi régulier satisfaisant de troupeaux grâce à un dépistage mis en place à l'abattoir, dans la mesure où la sensibilité de groupe augmente rapidement avec le nombre d'animaux infectés par élevage infecté. Ces valeurs sont en effet un peu supérieures à celles obtenues par NIELSEN et al (1996) pour la recherche d'anticorps anti-salmonelles. Dans notre étude, tous les élevages qui étaient infectés ont été dépistés grâce aux extraits musculaires, même si pour certains animaux considérés indépendamment, le résultat faisait preuve d'un manque de sensibilité.

De plus, nous avons vérifié que la vaccination des porcs avec des vaccins déléétés n'induisait pas de problème de spécificité dans la détection des anticorps anti-gE. Tous les lots de porcs prélevés en abattoir provenaient effectivement d'élevages vaccinant les animaux en intramusculaire une ou deux fois avec un vaccin adjuvé, sans que l'on puisse établir une corrélation entre la vaccination et une détection d'anticorps anti-gE.

En conclusion, en travaillant à l'abattoir avec un nombre suffisant de prélèvements par élevage et à une fréquence qui reste à déterminer en fonction du plan de prophylaxie mis en oeuvre, l'utilisation des extraits musculaires pourrait remplacer avantageusement les sérums dans le suivi sérologique d'un plan de contrôle de la maladie d'Aujeszky.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Dr E. SELLAL (LSI) pour la fourniture gracieuse des trousseaux ELISA, le Dr Y. LEFORBAN pour sa contribution à l'étude préalable de faisabilité, M. Y. CHAUVEL (COOPERL) pour son aide lors de la réalisation des prélèvements. Cette étude a été financée par l'Association Régionale Interprofessionnelle Porcine de Bretagne.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOUWKAMP F.T., STEGEMAN J.A., KIMMAN T.G., 1993. *The Vet. Rec.*, 134, 327-330.
- ÉLOIT M., FARGEAUD D., VANNIER P., TOMA B., 1989. *The Vet Rec.* , 124, 91-94.
- NIELSEN B., BAGGESEN D.L., LIND P., FELD N., WINGSTRAND A., 1996. *Proceedings 14th IPVS Congress, Bologna, Italy, 7-10 July 1996.*