

DIAGNOSTIC RAPIDE DES INFECTIONS VIRALES RESPIRATOIRES DU PORC PAR IMMUNOFLUORESCENCE SUR CELLULES DES CAVITÉS NASALES

A. JESTIN(1), M. ONNO(1), F. MADEC(1), C. KAISER(2)

Ministère de l'Agriculture

(1) *Station de Pathologie Porcine, BP 9, 22440 - PLOUFRAGAN, FRANCE*

(2) *Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, BP 67, 94703 - MAISONS-ALFORT Cedex, FRANCE*

INTRODUCTION

Chez le porc charcutier, notamment dans les régions de hautes densités d'élevages, les troubles respiratoires aigus regroupés sous le vocable de syndromes grippaux sont fréquents. Une étude récente (MADEC et al, 1987) a montré qu'ils correspondent le plus souvent à une étiologie virale, bien que dans certains cas et du seul point de vue clinique les épisodes de pleuropneumonie (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) s'apparentent étrangement aux infections virales. Les agents viraux en cause sont soit des orthomyxovirus ou virus grippaux : HSW₁N₁ (MADEC et al, 1983), HSW₃N₂ (MADEC et al, 1984), soit l'herpesvirus de la maladie d'Aujeszky (VANNIER, 1984), soit le coronavirus respiratoire porcine ou virus «TGE-like» (JESTIN et al, 1987 ; LAUDE et al, 1987 ; DURET et al, 1988). Les tests sérologiques peuvent être utilisés pour le diagnostic de telles infections. La recherche des anticorps sériques plusieurs jours après l'apparition des troubles confère à ces résultats une valeur rétrospective et les mesures immédiatement à mettre en oeuvre ne sont pas dictées par les résultats de ces tests. De plus la mise en place de prophylaxies vaccinales contre la maladie d'Aujeszky et les gripes porcines rend la situation confuse. Le diagnostic peut également être effectué par isolement viral, techniques nécessitant des cultures cellulaires ou des oeufs embryonnés. Le coût élevé et la lenteur des résultats font souvent hésiter les vétérinaires amenés à intervenir dans les élevages. D'où l'idée de mettre au point une méthode de diagnostic mieux adaptée aux exigences et contraintes des utilisateurs.

Le principe est basé sur la détection par voie immuno-enzymatique des antigènes viraux dans les cellules épithéliales des cavités nasales des porcs. Cette publication se propose de rendre compte des résultats de son application dans le cadre d'une étude épidémiologique pilote réalisée en 1987 à propos des syndromes grippaux chez le porc charcutier en Bretagne.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Réalisation des prélèvements

Un groupe de 12 vétérinaires a participé à la collecte des

prélèvements dans des élevages dont les porcs charcutiers présentaient des manifestations grippales. 40 élevages ont été ainsi considérés et 387 porcs charcutiers ont été prélevés (8 à 10 par élevage). Les cellules de la muqueuse nasale sont prélevées par écouvillonnage (ETP-CML). Après prélèvement, les écouvillons sont introduits dans un tube contenant un milieu de culture additionné de conservateurs. L'ensemble des tubes est alors expédié par la poste au laboratoire de la Station de Pathologie Porcine dans une enveloppe spéciale. Lors de cette visite une prise de sang est également réalisée sur chaque porc et la température rectale est relevée. Trois semaines plus tard une seconde série de prises de sang est effectuée pour l'étude de la cinétique des anticorps à l'égard des infections virales considérées : gripes (HSW₁N₁, HSW₃N₂), Maladie d'Aujeszky et Coronavirose respiratoire. Après analyse au laboratoire une première restitution des résultats à pu se faire par téléphone.

1.2. Le traitement des prélèvements

Les écouvillons sont traités dès leur arrivée au Laboratoire. Les cellules présentes sont détachées du coton de l'écouvillon par agitation du tube. Une partie du liquide de transport est destinée aux essais d'isolement viral en cultures cellulaires ou sur oeufs embryonnés. L'autre partie est destinée aux tests de détection rapide des antigènes viraux dans les cellules. La suspension cellulaire est ainsi centrifugée à 400 g pendant 10 minutes à 4°C pour sédimenter les cellules. Celles-ci sont remises en suspension dans 2 ml de tampon phosphate (PBS, pH = 7,4) additionné à 2 % de dimercaptoethanol utilisé pour ses propriétés mucolytiques. Après un second cycle de centrifugation les cellules sont remises en suspension dans le tampon phosphate (800 000 cellules/ml). Un volume de 25 µl de cette suspension est déposé dans un des dix puits d'une lame spéciale pour immunofluorescence (BIOMERIEUX réf 7575). Au total trois lames sont préparées. Après séchage les cellules sont fixées dans l'acétone à -20°C pendant 30 minutes. Les lames sont colorées immédiatement (dans certaines circonstances, week-end, elles ont pu être conservées à -70°C après fixation à l'acétone).

1.3. Les réactifs et la réaction d'immunofluorescence

Un mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre la nucléoprotéine des virus Influenza A(1) a été utilisé pour la détection de la grippe (WALLS et al, 1986). En ce qui concerne la maladie d'Aujeszky c'est l'anticorps monoclonal (52AA6K22) spécifique du virus Aujeszky et qui reconnaît la glycoprotéine gII de l'enveloppe virale qui a été utilisé (ELOIT et al, 1988).

Enfin pour le test de la coronavirose respiratoire on a eu recours à un mélange de deux anticorps monoclonaux reconnaissant le virus : un anticorps reconnaissant la nucléoprotéine NP (5.1) et un second reconnaissant la glycoprotéine d'enveloppe E₂ (20.9). Une immunoglobuline de lapin, dirigée contre les immunoglobulines de souris et conjuguée à la fluoresceine (DIAGNOSTIC PASTEUR PARIS) est utilisée dans la seconde étape du test pour la détection des antigènes viraux dans les cellules.

1.4. Examen au microscope

Les lames sont examinées au microscope sous lumière UV (G = x 400). Les prélèvements contenant au minimum deux cellules fluorescentes sont considérées comme positifs.

1.5. Isolement viral

Le virus de la maladie d'Aujeszky et le coronavirus respiratoire sont isolés respectivement sur cellules de rein de porc (PK15) et cellules testiculaires de porc (ST). 100µl de suspension sont inoculés sur tapis cellulaires et sont incubés une heure à 37°C. Quotidiennement les tapis cellulaires sont examinés au microscope pendant une semaine pour la mise en évidence des effets cytopathiques. Trois passages sont systématiquement effectués. Les virus influenza sont recherchés par inoculation d'oeufs embryonnés. Les virus isolés sont identifiés par les méthodes de référence.

1.6. Examens sérologiques

Les sérums provenant des animaux prélevés au moment du premier passage et trois semaines plus tard sont analysés selon les techniques classiques, pour la maladie d'Aujeszky (VANNIER, 1984), le coronavirus respiratoire (TOMA et BENET, 1976) et les virus grippaux (AYMARD et al, 1980).

2. RÉSULTATS

2.1. Symptômes cliniques

L'anorexie est en général le symptôme dominant. Les autres signes sont l'hyperthermie, la toux, la dyspnée, la polypnée et parfois le jetage nasal. Cependant l'intensité des troubles varie d'un élevage à l'autre. Parfois tous les animaux sont affectés et les troubles respiratoires prononcés, dans les cas les plus typiques l'hyperthermie et l'anorexie durent entre 48 et 72 heures. L'hyperthermie est en général intense et les températures supérieures à 41°C ont été observées dans 20 élevages. Dans quelques élevages la mortalité a été élevée.

2.2. Acheminement des prélèvements

La voie postale s'est avérée excellente pour l'acheminement

(1) Ces anticorps proviennent du CENTER FOR DISEASE CONTROL d'ATLANTA aux USA

des prélèvements. Postés l'après-midi, les prélèvements sont le plus souvent arrivés le lendemain matin.

2.3. Les résultats sérologiques

L'infection par le virus de la maladie d'Aujeszky a été confirmée dans 5 élevages. Le passage des virus grippaux et du coronavirus respiratoire a été sérologiquement diagnostiqué dans respectivement 24 et 3 élevages. Ainsi dans 8 élevages aucune étiologie virale n'a pu être incriminée (tableau 1).

TABLEAU 1
NOMBRE D'ÉLEVAGES INFECTÉS
RÉSULTATS DES ANALYSES SÉROLOGIQUES

	Nombre d'élevages
Virus de la Maladie d'Aujeszky	5
Influenza virus	24
Coronavirus respiratoire	3
Aucune séroconversion	8
TOTAL	40

2.4. Détection des antigènes viraux dans les cellules des cavités nasales

2.4.1. Les images de fluorescence

Les images des cellules provenant de porcs infectés par le virus de la maladie d'Aujeszky ou les virus grippaux se caractérisent par une répartition régulière et uniforme de la fluorescence dans le cytoplasme et le noyau. La présence des antigènes du coronavirus respiratoire se traduit par des images de fluorescence uniquement localisée dans le cytoplasme des cellules infectées.

2.4.2. Sensibilité du test d'immunofluorescence

La sensibilité du test d'immunofluorescence pour la détection des trois virus respiratoires est sensiblement équivalente (Tableau 2). D'une valeur voisine de 30 %, elle reste relativement faible quand les résultats sont étudiés à l'échelle du porc. Par contre l'étude de ces résultats dans une démarche plus globale du diagnostic dans un élevage montre que la sensibilité de cette technique est de l'ordre de 70 % pour les gripes, 80 % pour la Maladie d'Aujeszky et 100 % pour la coronavirose respiratoire.

2.4.3. Spécificité du test d'immunofluorescence

La spécificité de cette technique d'immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux s'avère être satisfaisante (Tableaux 2 et 3). Toutefois dans un élevage des images de fluorescence avec les réactifs spécifiques des virus grippaux ont été visualisées au microscope dans les prélèvements provenant de deux porcs. Dans cet élevage les études sérologiques n'ont pas confirmé l'infection par un myxovirus et la signification de ce résultat discordant n'est pas connue (Tableau 2). Par ailleurs dans tous les cas, aucune réaction croisée entre les trois types d'infection n'a été notée.

TABLEAU 2
SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DU TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE (Diagnostic individuel, 387 porcs)
COMPARAISON AVEC LA SÉROLOGIE, MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

	Test sérologique		Test Immunofluorescence	
			+	-
Virus de la Maladie d'Aujeszky	+	47	11 (24 %)	36
	-	340	0	340 (100 %)
Virus Influenza	+	161	52 (32 %)	109
	-	226	2	224 (99 %)
Coronavirus respiratoire	+	25	7 (28 %)	18
	-	362	0	362 (100 %)

TABLEAU 3
SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DU TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE
(Diagnostic À l'échelle du groupe de porcs prélevés)
COMPARAISON AVEC LA SÉROLOGIE

	Test sérologique		Test Immunofluorescence	
			+	-
Virus de la Maladie d'Aujeszky	+	5	4 (80 %)	1
	-	35	0	35 (100 %)
Virus Influenza	+	24	17 (70,8 %)	7
	-	16	1	15 (93,7 %)
Coronavirus respiratoire	+	3	3 (100 %)	0
	-	37	0	37 (100 %)

2.4.4. Les techniques d'isolement viral et de détection des antigènes par immunofluorescence : sensibilités comparées

L'étude des résultats individuels montre clairement que les sensibilités relatives de ces deux techniques dépendent du type de virus. En effet l'infection par le virus de la maladie d'Aujeszky est plus fréquemment diagnostiquée par l'isole-

ment viral (Tableau 4). Par contre, l'infection par les virus grippaux est plus fréquemment détectée par la technique d'immunofluorescence. Pour le coronavirus, les tentatives d'isolement viral sur cultures cellulaires sont restées négatives dans notre laboratoire. L'étude des résultats concernant la grippe à l'échelle des lots de porcs démontre que le test s'est avéré deux fois plus sensible que l'isolement viral (Tableau 5).

TABLEAU 4
SENSIBILITÉS COMPARÉES DU TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE
ET DE L'ISOLEMENT VIRAL (Diagnostic individuel, n = 387 porcs)
COMPARAISON À LA SÉROLOGIE, MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

	Test sérologique	Isolement viral	Test d'immunofluorescence
Maladie d'Aujeszky	100 %	46 %	24 %
Virus influenza	100 %	26 %	32 %
Coronavirus respiratoire	100 %	ND	28 %

TABLEAU 5
SENSIBILITÉS COMPARÉES DU TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE ET DE L'ISOLEMENT VIRAL
(diagnostic à l'échelle du lot de porcs prélevés)

	Test sérologique	Isolement viral	Test d'immunofluorescence
Maladie d'Aujeszky	100 %	80 %	80 %
Virus influenza	100 %	37,5 0 %	70 %
Coronavirus respiratoire	100 %	0 %	100 %

2.4.5. Relation entre le degré d'hyperthermie des animaux prélevés et la sensibilité de la technique

Pour cette étude, ne sont pris en considération que les élevages pour lesquels l'étiologie virale en présence a été diagnostiquée. Étaient en hyperthermie (> 40°C) seulement 61,70 et 87 p. cent des animaux prélevés dans les élevages infectés respectivement par le V. M. A., les virus grippaux et le coronavirus respiratoire (Tableau 6). La probabilité de

détecter les antigènes viraux dans les écouvillons provenant d'animaux en hyperthermie (> 40°C) est voisine de $p = 0,30$ et ceci quel que soit le type de virus en présence. Dans ces conditions la probabilité de réaliser un bon diagnostic par l'immunofluorescence est $p = 0,98$ quand 10 porcs en hyperthermie sont prélevés.

TABLEAU 6
INFLUENCE DE NIVEAU DE LA TEMPERATURE RECTALE DES ANIMAUX PRELEVES SUR LA FREQUENCE DE DETECTION PAR IMMUNOFLUORESCENCE DES ANTIGENES VIRAUX DANS LES PRODUITS D'ECOUVILLONNAGES NASAUX

	Température rectale	Test d'immunofluorescence positif
Virus de la Maladie d'Aujeszky	T < 40	17 %
	40 < T	28 %
Virus Influenza	T < 40	24 %
	40 < T	32 %
Coronavirus respiratoire	T < 40	30 %
	40 < T	29 %

DISCUSSION

Une étroite collaboration entre la Station de Pathologie Porcine et les vétérinaires a permis de mener à bien ce premier essai de diagnostic rapide au sein d'un mini-réseau de correspondants dans les différentes zones d'élevage. La distribution d'un matériel adapté de prélèvements, trousse d'écouvillons et d'expédition ; enveloppes préimprimées, aura grandement contribué à la rapidité d'acheminement vers le laboratoire de prélèvements de grande qualité. L'expédition par voie postale s'est avérée également très efficace. Cette première étape d'évaluation des techniques d'immunofluorescence a exigé de la part des vétérinaires lors de la première visite un travail de relevé rigoureux des températures, d'identification des animaux en plus de la collecte des écouvillons, une seconde visite a été exigée pour la collecte de sérums indispensables pour la confirmation sérologique de l'infection. Cette procédure lourde devrait, après cette première phase d'évaluation, être simplifiée, une dizaine d'écouvillons prélevés sur des animaux en hyperthermie devrait satisfaire aux exigences de la technique pour l'établissement d'un diagnostic rapide.

La mise au point d'un réseau d'épidémiosurveillance permis

par le traitement rapide des prélèvements et la distribution également rapide de l'information n'a pu se faire que dans un contexte de concertation.

Des informations épidémiologiques provenant de certaines régions d'élevage pourraient être rapidement transmises aux responsables des autres régions et aux autorités sanitaires afin de prendre toutes les mesures à l'échelon régional ou national.

Des antigènes d'orthomyxovirus ont été détectés dans les produits d'écouvillonnage provenant de deux porcs d'un élevage n'ayant pas présenté de séroconversion, le virus n'ayant pas été isolé. Ces résultats n'indiquent pas nécessairement un manque de spécificité de la méthode d'immunofluorescence, en effet la technique d'hémolyse radiale se révèle ne pas détecter les anticorps dans tous les élevages. Il est également possible que les anticorps spécifiques ne soient pas présents à un taux détectable au moment de la collecte des sangs. En effet EASTERDAY (1972) rapporte que pour certains porcs les anticorps ne sont détectables que plusieurs semaines après l'infection. L'absence d'isolement viral ne permettra pas de

confirmer ces résultats et d'élucider ces discordances.

Les anticorps monoclonaux utilisés pour la détection des antigènes viraux dans les cellules nasales sont spécifiques des épitopes hautement stables de la nucléoprotéine des orthomyxovirus A (WALLS et al, 1986). Il est à regretter que pour le moment les anticorps monoclonaux spécifiques des hemagglutinines H3 ou H1 ne soient pas encore disponibles pour ce type d'usage. Des essais de détection des antigènes viraux dans les poumons d'animaux morts ou euthanasiés ont été testés avec succès, les auteurs utilisaient des anticorps polyclonaux (PENSAERT et al, 1987).

Les anticorps monoclonaux utilisés pour la détection des antigènes du coronavirus respiratoire reconnaissent également des épitopes du virus de la Gastro-entérite Transmissible. Dans ces conditions le diagnostic n'est pas spécifique du coronavirus respiratoire. Cependant si de nombreux auteurs ont montré que l'appareil respiratoire est un des sites de replication du virus GET (UNDERDAHL et al, 1975, KEMENY et al, 1977) l'absence de troubles digestifs reste en faveur de l'absence de ce virus dans les élevages. La production d'anticorps monoclonaux spécifiques du coronavirus respiratoire permettrait d'améliorer la spécificité du test.

Cette technique du diagnostic rapide par détection des

antigènes viraux dans les écouvillons nasaux est utilisée dans le milieu pédiatrique (ORSTAVIK et al, 1984). D'autres techniques peuvent être envisagées utilisant la détection des antigènes par le test ELISA (JESTIN et al, 1988) ou l'hybridation par sondes moléculaires. Des essais ont été effectués avec succès pour la détection du génome du virus de la maladie d'Aujeszky à l'aide de sondes marquées avec des radioéléments artificiels (BELAK et al, 1987). Les sondes non radioactives dites «froides» telles les sondes biotinylées n'ont pas donné de résultats satisfaisants à ce jour.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les vétérinaires qui ont bien voulu participer à l'évaluation de ces techniques de diagnostic rapide : Mlle LE DANTEC, Mrs ALNO, AUTRET, GOUPIL, GUILLEMOT, GUILMOTO, JEZEQUEL, JOLLY, NOIRIT, POMMIER, RENAULT, RIAUCOURT.

Les anticorps monoclonaux spécifiques des virus grippaux ont été produits au CONTROL CENTER OF DISEASE d'ATLANTA (USA) et fournis par le Professeur M. AYMARD, OMS - LYON. Les anticorps spécifiques du virus de la maladie d'Aujeszky ont été produits à l'Ecole Nationale Vétérinaire de MAISONS-ALFORT (M. ELOIT). Les anticorps monoclonaux spécifiques du virus GET ont été produits à l'INRA de THIVERVAL-GRIGNON et fournis par H. LAUDE. Les auteurs remercient Professeur M. AYMARD, M. ELOIT et M. LAUDE pour la fourniture des anticorps monoclonaux.

BIBLIOGRAPHIE

- AYMARD M., MILLION J., KERSLER N., 1980. Path. Biol., **28**, 8, 535-539
- BELAK S., ROCKBORN G., WIERUP M., BELAK K., BERG M., LINNE J. 1987. J. Vet. Med. B, **34**, 519-529
- DE LEUN P. W., VAN OIRSCHOT J. T., 1985. The Vet. Quart., **7**, 191-197
- DURET C., BRUNA., GUILMOTO H., DAUVERGNE M., 1988. Rec. Med. Vet. **164**, 221-226
- EASTEERDAY B. C., 1972. Am. J. Vet. Res., **2**, 645-650
- ELOIT M., FARGEAUD D., L'HARIDON R., TOMA B. 1988. Arch. Virol., **99**, 45-56
- LEFORBAN Y., VANNIER P., 1987. Journées Rech Porcine en France, **19**, 167-172
- JESTIN A., MEYER A., ONNO M., MADEC F., VANNIER P., 1988. Am. J. Vet. Res. (soumis au Comité de lecture)
- HAESEBROUCK F., PENSAERT M. B., 1986. Vet. Microb., **11**, 239, 249
- JAKAB G. T., 1982. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., **26**, 155-171
- KEMENY L. J., WOODS R. D., 1977. Am. J. Vet. Res., **38**, 307-310
- LAUDE H., GELFI J., RASSCHAERT D., DELMAS B., 1987. Journées Rech Porcine en France, **20**, 89-94
- LAUDE H. CHAPSAL J. M., GELFI J., LABIAU S., GROSCLAUDE J., 1986. J. Gen. Virol., **67**, 119-130
- MADEC F., GOURREAU J. M., KAISER C., VIGOUROUX A., SAL-INGARDES F., PRIME P., 1983. Journées Rech. Porcine en France, **15**, 419-430
- MADEC F., GOURREAU J. M., KAISER C., AYMARD M., 1984. Bull. Acad. Vet. de France, **57**, 513-522
- MADEC F., KAISER C., JESTIN A., GOURREAU J. M., 1987. Le Point Vet., **19**, 654-659
- ORSTAVIK I., GRANDIEN M., HALONEN P. et al, 1984. Bull. W. H. O., **62**, 307- 313
- ONNO M., 1986. DEA de Biologie Agronomie Université Rennes I
- PENSAERT M., HAESEBROUCK F., CASTRYCK F. (1987). IPVS August 1987 Barcelone p 215
- TILLON J. P., VANNIER P., KOBISCH M., 1981. Bull. Lab. Vet. **3**, 63-83
- TOMA B., BENET J. J., 1976. Rev. Med. Vet., **9**, 152-154
- UNDERDAHL N. R., MEBUS C. A., TORRES-MEDINA A., 1975. Am. J. Vet. Res., **36**, 1473-1476
- VANNIER P., GOURREAU J. M., KAISER C., 1985. Can. Vet. J., **26**, 138-143
- WALLS H. H., HARMON M. W., SLAGLE J. J., STOCKSDALE C., KENDAL A. P., 1986. J. Clin. Microbiol., **23**, 240-245