UTILISATION D'UN TEST ELISA POUR LA SEROLOGIE DE LA PESTE PORCINE CLASSIQUE

Y. LEFORBAN

Ministère de l'Agriculture, Station de Pathologie Porcine, BP 9, 22440 - PLOUFRAGAN - FRANCE

INTRODUCTION

De nombreuses méthodes de détection des anticorps sériques dirigés contre le virus de la Peste Porcine Classique (PPC) ont été décrites : immunoprécipitation en gélose (DARBYSHIRE, 1962), fixation du complément (ESKILDSEN et col, 1976), immunoélectro-osmophorèse (TERPSTRA, 1978), hémagglutination passive (LABADIE et coll, 1977). Cependant ce sont les techniques basées sur le principe de la neutralisation du virus qui sont les plus fiables et les plus largement utilisées actuellement (CORTHIER et coll, 1974), ceci en raison de la spécificité étroite des anticorps recherchés vis-à-vis des antigènes de surface du virus.

C'est le test de neutralisation révélé par immunofluorescence (NIF) qui est actuellement utilisé en France par le Laboratoire National de Référence et les laboratoires habilités pour la sérologie PPC. La technique retenue est une technique sur microplaque dont le protocole a été codifié (COSTES et col, 1982). Cent doses infectieuses fluorescentes 50 p. cent (DIF 50) de virus Peste Porcine (souche A19) sont mises en présence du sérum à tester, à partir de la dilution initiale de 1/10. Le titre neutralisant du sérum est exprimé par l'inverse de sa dilution finale neutralisante 50 p. cent. Une autre technique utilisant une souche cytopathique a aussi été développée en France (LAUDE et coll, 1980 ; VANNIER et coll, 1984). Plus récemment, une technique immunoenzymatique de révélation de la séroneutralisation, a été substituée à l'immunofluorescence, dans certains laboratoires étrangers (HOLM JENSEN, 1981, 1985).

Tous ces tests de recherche des anticorps neutralisants donnent des résultats comparables quel que soit le mode de lecture retenu (Commission of the European Communities, 1986). Cependant s'ils donnent tous d'excellents résultats, ils nécessitent en revanche un personnel hautement qualifié et un équipement assez important qui limite, de fait, leur mise en oeuvre à un nombre très restreint de laboratoires.

La nécessité de recourir à d'autres techniques plus simples ne faisant pas appel aux cultures cellulaires nous a conduit à nous

intéresser au test ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay) à partir de 1986. C'est cette méthode que nous avons testée en France et nous rapportons ici le résultat de son utilisation sur des sérums de référence, des sérums de porcs d'expérience et sur des sérums du terrain. L'étude de la concordance des résultats obtenus en ELISA, avec ceux des techniques de séroneutralisation (SNT) et NIF utilisées jusqu'à présent dans la sérologie des Pestivirus, sera particulièrement développée, alors que la phase de mise au point du test, déjà décrite par ailleurs (HAVE, 1984), ne sera traitée que succinctement.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Principe

Le test est basé sur le principe de la compétition, consistant à révéler les sites antigéniques non saturés par les anticorps du sérum à tester, au moyen d'un sérum hyperimmun spécifique du virus (HAVE, 1984). Le sérum de porc à tester est mis en contact avec l'antigène viral fixé au fond des cupules, puis dans un deuxième temps, les sites antigéniques restés libres sont révélés par un sérum anti virus préparé sur lapins dans le cas de la Peste. Les immunoglobulines de lapins fixées spécifiquement sont elles-mêmes mises en évidence par un antisérum marqué à la peroxydase et l'orthophénylène Diamine (OPD) est utilisé comme chromogène final.

1.2. Expression des résultats

Un sérum de porc de référence, dépourvu d'anticorps sert de base d'appréciation de la densité optique (DO). L'importance de l'inhibition provoquée par le sérum à tester, est appréciée par rapport à la DO obtenue avec ce sérum "négatif" de référence. Elle est exprimée par le pourcentage d'inhibition de DO calculé à partir de la formule utilisée par SORENSEN et LEI pour l'expression des titres en anticorps dirigés contre le virus de la maladie d'Aujeszky, détecté au moyen de la même

méthode de "blocking" (SORENSEN et coll, 1986).

$$IDOp = \frac{100 - \text{Densité optique du sérum à tester} \times 100}{\text{Densité optique du sérum négatif de référence}}$$

Plus cet index, IDOp est grand, plus la quantité d'anticorps contenue dans le sérum est élevée. Certains sérums dépourvus d'anticorps peuvent présenter des DO supérieures à la DO du sérum "négatif" de référence, ce qui conduit à exprimer leur IDOp par un nombre négatif.

1.3. Réactifs

1.3.1. Antigène et sérum hyperimmun Peste Porcine

L'antigène viral, le sérum hyperimmun de lapin anti virus PPC et les autres réactifs sont préparés et utilisés selon la méthode déjà décrite (HAVE, 1984, LEFORBAN et coll, 1987).

Un réactif de contrôle sans virus est préparé dans les mêmes conditions que l'antigène. Il est utilisé pour tester la spécificité de chaque lot d'antigène. Ce test préliminaire de spécificité est effectué en même temps que le titrage de l'antigène.

1.3.2. Antigènes et sérums hyperimmuns, Maladie des Muqueuses et Border Disease

L'antigène Maladie des Muqueuses est produit sur cellules primaires de rein de fœtus bovins, l'extraction de l'antigène est pratiquée selon le protocole décrit pour le virus Peste Porcine. Le sérum hyperimmun également d'origine bovine, nous a été aimablement fourni par le Docteur S. Edwards du Laboratoire de Weybridge en Angleterre.

L'antigène et le sérum de lapin anti Border Disease souche Aveyron sont obtenus à partir de la souche virale (aimablement fournie par le Docteur G. CHAPPUIS de la Société RHONEMERIEUX) dans les mêmes conditions que celles décrites pour le virus Peste Porcine (LEFORBAN et coll, 1987 ; LEFORBAN, 1988).

1.3.3. Sérums de porc étalons

Des sérums étalons positifs et négatifs sont déposés sur chaque plaque dans les conditions suivantes :

- sérum négatif : il s'agit d'un sérum de porc Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique (EOPS) provenant de l'élevage de la Station de Pathologie Porcine (SPP). Le même sérum est utilisé pour tous les tests. Il est déposé à la dilution du demi dans 4 cupules non contiguës. Les densités optiques sont lues à l'aide d'un spectrophotomètre (Dynatech MR 700), et les dilutions des différents réactifs sont déterminées de manière à obtenir une DO comprise entre 0,800 et 1,400 pour les 4 cupules contenant ce sérum négatif. La moyenne ainsi que le coefficient de variation (CV) des DO de ces 4 cupules sont calculées pour chaque plaque et les résultats de la plaque ne sont pris en compte que si les valeurs de DO sont bien comprises entre les deux limites et si le CV est inférieur à 10 p. cent.
- sérum positif : sont utilisés comme sérums étalons respectivement pour chaque antigène, des sérums hyperimmuns anti Peste Porcine anti Maladie des Muqueuses et anti Border Disease préparés sur porcs EOPS dans notre laboratoire. L'utilisation du sérum étalon positif sur chaque plaque

permet de contrôler la spécificité de la réaction d'inhibition. L'encadrement du 50 % d'IDOp par deux dilutions de ce sérum fixe les limites de sensibilité permettant ou non de valider les résultats obtenus sur la plaque. Dans le test ELISA Peste un sérum limite correspondant aux 25 p. cent d'inhibition a été inclus en remplacement des deux dilutions encadrant le 50 %

1.4. Sérums analysés

1.4.1. Nature et origine

Deux catégories de sérums de porcs ont été analysées : des sérums considérés comme référence pour la phase de mise au point du test ELISA dans notre laboratoire et des sérums du terrain pour éprouver la méthode dans les conditions réelles d'utilisation.

1.4.1.1. Sérums de référence

Les sérums de référence avaient préalablement été éprouvés en Peste par la technique de séroneutralisation (NIF).

Les sérums trouvés négatifs par le test NIF, au nombre de 65 avaient deux origines :

- le Laboratoire National de Référence de Maisons-Alfort (LCRV) pour 18 sérums (sérums nationaux de référence utilisés pour le test NIF),
- l'élevage de porcs EOPS de la Station de Pathologie Porcine pour 47 sérums.

Les 84 sérums révélés positifs par le test NIF provenaient de trois origines :

- le Laboratoire National de Référence pour 38 sérums (sérums nationaux de référence utilisés pour le test NIF),
- des porcs vaccinés puis inoculés avec une souche virulente d'épreuve (souche Manche = M'1.3.) à la Station de Pathologie Porcine, pour 13 sérums,
- des truies vaccinées avant 1983 avec le virus lapinisé souche C ou la souche Thiverval (33 sérums prélevés dans des élevages).

1.4.1.2. Sérums du terrain

Un premier groupe de 1264 sérums a été prélevé au hasard sur des truies de réforme à l'abattoir dans le cadre d'une enquête épidémiologique nationale effectuée en 1986. Les élevages d'origine des truies, au nombre de 495 ont été répertoriés. Parmi ces 1264 sérums, 29 ont été choisis pour réaliser la sérologie différentielle Pestivirus en Séroneutralisation et en ELISA. Ces 29 sérums ont été initialement classés à l'intérieur de trois sous-groupes en fonction de leur réponse en séroneutralisation vis-à-vis des 3 Pestivirus, Peste (HCV), Maladie des Muqueuses (BVD) et Border Disease (BD).

Un deuxième groupe de 85 sérums prélevés sur 74 truies et leurs porcelets ont été obtenus à partir de 8 élevages dans lesquels des sérologies positives en Peste avaient été trouvées lors de l'enquête abattoir. Ces sérologies positives correspondaient pour la majorité à une contamination par un Pestivirus hétérologue et pour quelques sérums à des vieilles truies vaccinées contre la Peste avant 1983. Parmi les 74

animaux testés, 11 ont fait l'objet de deux contrôles successifs à intervalle de 2 à 4 mois.

1.4.2. Recherche des anticorps neutralisants

Cette recherche a été réalisée par le Laboratoire National de Référence (LCRV - Maisons-Alfort) pour ce qui concerne l'ensemble des sérums positifs de référence et 18 sérums négatifs. Les 47 autres sérums négatifs de référence ont été testés dans notre laboratoire par la technique NIF.

Les sérums du terrain ont été testés dans notre laboratoire par la technique NIF à la dilution initiale du 1/10 pour la recherche des anticorps anti Peste Porcine. Tous les sérums trouvés positifs à cette dilution ont ensuite été titrés (COSTES et coll, 1982). Ces sérums positifs vis-à-vis du virus PPC, ont également été testés par la technique de séroneutralisation pour la recherche des anticorps spécifiques des autres Pestivirus : le virus de la Border Disease (BDV), et le virus de la Maladie des Muqueuses (BVD). La technique de séroneutralisation utilisée est la méthode habituelle pratiquée dans notre laboratoire pour tous les virus à effet cytopathique (VANNIER, 1985). La souche NADL du virus BVD propagée sur cellules primaires de rein de fœtus bovin a été utilisée pour la recherche des anticorps neutralisant anti BVD. La dilution initiale du sérum est celle retenue pour la recherche des anticorps neutralisant le virus PPC, soit 1/10 et le titre est exprimé de la même façon par l'inverse de la dilution neutralisante 50 %. La souche Edimbourg de virus BD cultivée sur cellules primaires de rein d'agneau ainsi que la souche Aveyron cultivée sur cellules PK15 ont permis la mise en évidence des anticorps neutralisants anti BD, le virus Aveyron étant alors révélé par la technique NIF comme le virus PPC.

1.5. Réalisation du test ELISA

Le test est pratiqué sur des microplaques, tous les réactifs étant utilisés sous un volume de 100 microlitres.

Le contrôle initial de la spécificité de chaque lot d'antigène est effectué en comparant les DO obtenues avec ce lot, à celles fournies par le réactif de contrôle sans virus utilisé aux mêmes dilutions sur la même plaque en présence du sérum de porc étalon négatif : la DO obtenue avec le réactif de contrôle négatif doit être voisine du bruit de fond de la plaque. La technique ELISA proprement dite a déjà été décrite par ailleurs (HAVE, 1984 ; SORENSEN et coll, 1986 ; LEFORBAN et coll, 1987 ; LEFORBAN, 1988).

2. RESULTATS

2.1. Détermination du seuil de positivité à partir des sérums de référence

Le test a été étalonné à l'aide des 149 sérums de référence dont les titres en anticorps neutralisants Peste étaient connus.

La comparaison des résultats obtenus en séroneutralisation et en ELISA montre que les 65 sérums trouvés négatifs par le test NIF (titre inférieur à 20) ont tous donné en ELISA des IDO_p inférieurs à 25 (-11 à 19). La moyenne des IDO_p de ces sérums est 0,08 ± 6,46. Les 84 sérums, possédant des anticorps neutralisants de titre supérieur ou égal à 20, présentent tous une inhibition supérieure à 25 %, la valeur d'IDO_p la plus faible est 27 correspondant à un titre neutralisant de 1/30 (tableau 1).

TABLEAU 1
RECHERCHE DES ANTICORPS PESTE PORCINE : RELATION ENTRE LE POURCENTAGE D'INHIBITION DE D.O.(IDO_p)
OBTENU EN ELISA ET LE TITRE NEUTRALISANT (T.N.) DE 84 SÉRUMS POSITIFS DE RÉFÉRENCE
- DISTRIBUTION DES SÉRUMS EN FONCTION DE CES DEUX ACTIVITÉS ANTICORPS

Titre Neutralisant (T.N.) (1)	ELISA									Total
	< 10	10.19	20.29	30.39	40.49	50.59	60.69	70.79	> 80	
> 20 et < 40			1(2)	3	3	1				8
> 40 et < 80				2	3	5	1			11
> 80 et <160				3	2	5	3			13
>160 et <320				1	2	5	11	4		23
> 320					2	3	8	15	1	29
Total			1	9	12	19	23	19	1	84

(1) exprimé par l'inverse de la dilution neutralisante du sérum

(2) nombre de sérums

L'ensemble des résultats obtenus avec les 149 sérums de référence testés nous a conduits à retenir 25 % comme seuil de positivité de la méthode ELISA dans notre laboratoire.

2.2. Sérologies différentielles des 13 sérums de références positifs en Peste

Les résultats sont présentés au tableau 2. On peut observer que ces 13 sérums réagissent positivement en séroneutralisation (SN) avec le virus Peste (HCV) et négativement en SN avec les virus BVD et BDV. Ces résultats concordent avec

ceux du test ELISA puisque toutes les valeurs d'IDO_p sont > 25 avec l'antigène HCV et < 25 avec les antigènes BVD et BDV.

2.3. Application du test à la détection des anticorps sur des sérums de terrain

2.3.1. Sérums de truies collectés à l'abattoir

L'ensemble des résultats correspondant aux 1264 sérums est rapporté dans le tableau 3. Le tableau 4 donne les résultats synthétiques sous la forme d'un tableau de contingence

TABLEAU 2
RÉSULTATS COMPARATIFS EN SNT ET ELISA DES 13 SÉRUMS DE PORCS VACCINÉS AVEC LA SOUCHE CHINOISE ET ÉPROUVÉS
AVEC LA SOUCHE M'1.3

No du sérum	SNT (Inverse de la dilution)			ELISA (IDOp)		
	HCV	BVD	BDV	HCV	BVD	BDV
6119	320	< 10	< 10	60	7	0
6120	320	< 10	< 10	63	12	11
6121	80	< 10	< 10	37	7	7
6122	160	< 10	< 10	50	5	7
6123	160	< 10	< 10	55	16	5
6124	160	< 10	< 10	48	10	3
6125	160	< 10	< 10	49	11	0
6126	160	< 10	< 10	35	8	2
6127	40	< 10	< 10	56	5	0
6128	320	< 10	< 10	56	4	0
6129	320	< 10	< 10	56	10	7
6130	160	< 10	< 10	54	11	0
6131	320	< 10	< 10	56	7	2
MOYENNE ± SD	200 ± 100			51,9 ± 8,2	8,69 ± 3,37	3,38 ± 3,66

TABLEAU 3
RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI PESTE PORCINE CLASSIQUE : RELATION ENTRE LE POURCENTAGE D'INHIBITION DE
DENSITÉ OPTIQUE (IDOp) OBTENU EN ELISA ET LE TITRE NEUTRALISANT (T.N.) DE 1264 SÉRUMS DE TRUIES.
DISTRIBUTION DES SÉRUMS EN FONCTION DE CES DEUX ACTIVITÉS ANTICORPS

Titre Neutralisant (T.N.)	ELISA (IDOp)									Total
	< 10	10.19	20.29	30.39	40.49	50.59	60.69	70.79	> 80	
< 20	1166*	35	9	3	1					1214
> 20 et < 40		1	2	2	2	2				9
> 40 et < 80	1		1	3	1	3	2			11
> 80 et < 160			2	5	1	4	8	1		21
> 320					1		2	5	1	9
Total	1167	36	14	13	6	9	12	6	1	1264

* Nombre de sérums

TABLEAU 4
TABLEAU DE CONTINGENCE DES RESULTATS SÉROLOGIQUES COMPARÉS EN ELISA
ET SÉRONEUTRALISATION PESTE DE 1 264 SÉRUMS DE TRUIES

Titre neutralisant (T. N.)	ELISA (DOp)		Total
	Résultats négatifs (IDOp < 25)	Résultats positifs (IDOp > 25)	
Résultats négatifs (TN < 20)	1 201*	13	1 214
Résultats positifs (TN > 20)	2	48	50
TOTAL	1 203	61	1 264

* Nombre de sérums
Sensibilité (Se) = 0,96
Spécificité (Sp) = 0,99
Concordance (Co) = 0,99
Indice de Youden (Y) = 0,95

(FEDIDA et coll, 1986) dans lequel la technique de séroneutralisation (NIF) est technique de référence par rapport à la technique ELISA qui est la technique à tester, l'IDOp limite retenu étant le 25 %, déterminé précédemment avec les sérums de référence.

2.3.1.1. Sensibilité

Parmi les 50 sérums positifs en séroneutralisation, 2 sont trouvés négatifs en ELISA. Les tests de séroneutralisation effectués avec les souches de Pestivirus hétérogologues ont montré que l'un de ces sérums avait un titre neutralisant vis-à-vis du virus Border Disease supérieur au titre neutralisant vis-à-vis du virus PPC, tandis que le second toxique pour les cellules primaires de rein de foetus bovin et de rein d'agneau n'a pu être testé.

2.3.1.2. Spécificité

13 sérums présentent une réaction positive au test ELISA et négative au test de séroneutralisation. L'origine de ces sérums a été recherchée. Ils appartiennent aux 8 élevages dans lesquels des recherches sérologiques complémentaires ont été réalisées (2^e groupe de 85 sérums).

2.3.1.3. Répartition des valeurs d'IDOp

Sérums négatifs

Les 1203 sérums considérés comme négatifs par le test ELISA présentent des IDOp comprises entre -13 et 19. Ils se répartissent selon une distribution d'allure normale avec une moyenne très voisine de 0 ($0,54 \pm 5,73$). Il est à noter que le nombre de sérums présentant un IDOp compris entre 10 et 19 est faible (36 sérums) (tableau 3).

Sérums positifs

Les IDOp des 61 sérums considérés comme positifs par le test ELISA (Tableau 4) ont des valeurs se répartissant entre 25 et 80, moyenne $53,51 \pm 18,14$.

2.3.1.4. Résultats de la sérologie différentielle Pestivirus des 29 sérums de l'enquête abattoir

Ceux-ci sont présentés dans le tableau 5. Dans le sous-groupe I, les 6 sérums contenant des anticorps neutralisant le virus Peste sont également trouvés positifs en ELISA Peste ($IDOp > 34$) alors que les valeurs obtenues en ELISA BVD et BDV sont variables mais toutes inférieures à la valeur obtenue avec l'antigène Peste.

TABEAU 5
RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES 29 SÉRUMS DE TRUIE DU TERRAIN
EN SN ET EN ELISA VIS-A-VIS DES 3 PESTIVIRUS

Sous- Groupe	Numéro de sérum	SNT (inverse de la dilution)			Blocking ELISA (I. D. O.)p		
		HCV	BVD	BDV	HCV	BVD	BDV
I	P583	40	< 10	20	61	35	47
	P584	40	< 10	10	60	39	45
	P587	20	< 10	< 10	60	32	39
	P707	40	< 10	< 10	34	7	19
	P838	10	< 10	< 10	40	16	11
	P1215	80	< 10	< 10	69	13	39
II	P586	10	< 10	15	15	40	72
	P662	< 10	< 10	20	11	31	55
	P706	< 10	< 10	30	31	36	64
	P758	< 10	< 10	10	19	12	43
	P780	< 10	5	20	23	48	34
	P795	< 10	< 10	20	11	39	38
	P846	< 10	20	40	15	32	53
	P848	< 10	10	80	17	40	41
	P851	< 10	20	40	16	36	48
	P885	< 10	< 10	5	16	29	39
	P1001	< 10	10	20	20	28	48
III	P79	< 10	< 10	< 10	5	5	9
	P315	< 10	< 10	< 10	- 8	8	- 4
	P316	< 10	< 10	< 10	12	2	16
	P423	< 10	< 10	< 10	0	6	- 11
	P431	< 10	< 10	< 10	14	9	15
	P708	< 10	< 10	< 10	13	8	18
	P774	< 10	< 10	< 10	1	8	13
	P870	< 10	< 10	< 10	12	- 2	7
	P876	< 10	< 10	< 10	- 2	10	6
	P879	< 10	< 10	< 10	1	11	9
	P964	< 10	< 10	< 10	11	- 8	8
	P1285	< 10	< 10	< 10	17	8	6

Dans le sous-groupe II, parmi les 11 sérums contenant des anticorps neutralisant les virus BVD ou BDV, un seul réagit très faiblement en SN Peste (1/10). La réponse en ELISA de ce groupe de sérum est tout à fait similaire à la réponse en SN : valeurs d'IDOp avec les antigènes BVD et BDV supérieures aux valeurs d'IDOp avec l'antigène Peste.

Dans le sous-groupe III correspondant à 12 sérums dépourvus d'anticorps neutralisant Peste, BVD et BDV, toutes les valeurs d'IDOp sont < 25.

2.3.2. Sérums provenant des 8 élevages contaminés par un pestivirus hétérologue

Les deux tests, séroneutralisation et ELISA permettent également de différencier les truies ayant été infectées par un Pestivirus hétérologue des truies vaccinées contre la Peste avant 1983 dans les trois élevages où cohabitaient les deux catégories d'animaux. Dans les cinq autres élevages, seules des truies infectées par un Pestivirus hétérologue ont été détectées : la séroneutralisation et le test ELISA donnent des résultats concordants, le titre neutralisant et la valeur d'IDOp avec les virus BVD et Border Disease étant supérieurs à leurs valeurs respectives obtenues avec le virus Peste.

11 truies ont fait l'objet d'un deuxième contrôle sérologique après un délai de 2 à 4 mois : les résultats de ce deuxième contrôle, en SN comme en ELISA, sont très voisins de ceux du premier contrôle.

3 - DISCUSSION

Le choix du seuil d'inhibition est le point clef du test ELISA par compétition. C'est en effet de ce choix que dépendent la sensibilité et la spécificité de la réaction. L'étalonnage du test Peste réalisé avec les sérums de référence nous a conduits à fixer le seuil à 25 % d'inhibition. La distribution des IDOp inférieures à 25 correspondant à 1203 sérums négatifs du terrain revêt une allure tout à fait identique à celle des sérums de référence avec seulement 36 sérums dont le IDOp est compris entre 10 et 19 (tableaux 1 et 3).

Le choix d'un seuil d'inhibition faible donne donc une réaction très sensible, mais cette grande sensibilité ne s'accompagne pas dans la pratique d'une diminution notable de spécificité comme on aurait pu le redouter. La spécificité du test ELISA Peste est en effet acceptable, puisque 13 sérums seulement sur 1214 présentent une réaction positive par excès par rapport à la séroneutralisation. Le choix du seuil de 25 comme IDOp limite, paraît donc donner des résultats satisfaisants pour un dépistage portant sur un grand nombre de sérums, d'autant que tous les sérums considérés comme positifs par le test ELISA seront ensuite testés par séroneutralisation.

En revanche, les deux sérums considérés comme négatifs en ELISA alors qu'ils possédaient des anticorps neutralisants pourraient faire douter de la sensibilité de la méthode : en fait ces deux sérums proviennent vraisemblablement d'animaux infectés par des Pestivirus hétérologues ; la preuve en a été apportée pour l'un d'entre eux alors que le deuxième provient d'un élevage dans lequel des anticorps dirigés contre le virus Border Disease ont été détectés sur d'autres porcs.

Le test ELISA utilisant des antigènes préparés à partir des

virus de la Maladie des Muqueuses et de la Border Disease associés aux sérums hyperimmuns correspondants, s'est révélé capable de différencier les anticorps spécifiques du virus Peste Porcine d'avec les anticorps dirigés contre les autres Pestivirus. Ce test est aussi sensible et aussi spécifique que la Séroneutralisation utilisée jusqu'à présent. En revanche il ne semble pas possible avec ce test, de différencier les anticorps dirigés contre le virus de la Maladie des Muqueuses, d'avec les anticorps dirigés contre le virus de la Border Disease car les valeurs d'IDOp obtenues en ELISA avec les deux virus sont souvent très proches. Cette distinction ne présente d'ailleurs pas d'intérêt pratique dans le cadre de la sérologie porcine où l'essentiel est de faire la différence entre les anticorps spécifiques du virus Peste Porcine, d'avec les anticorps dirigés contre les Pestivirus des Ruminants (Maladie des Muqueuses ou Border Disease).

Dans l'ELISA différentielle Pestivirus sur sérums de porc, le choix d'un seuil de positivité paraît moins important que dans l'ELISA Peste. En effet l'ensemble de nos résultats montre que seule la différence entre le pourcentage d'inhibition obtenu avec l'antigène Peste et le pourcentage d'inhibition obtenu avec les antigènes Maladie des Muqueuses ou Border Disease est à prendre en considération pour un sérum donné. Des sérums de porcs contenant des anticorps pestivirus hétérologues à des titres élevés peuvent en effet donner une inhibition supérieure à 25 en ELISA Peste et à l'inverse des sérums contenant des anticorps Peste en grande quantité peuvent donner un score supérieur à 25 avec les Pestivirus hétérologues. Dans ces conditions si le seuil de positivité à 25 % est retenu pour l'ensemble des ELISA Pestivirus, on peut trouver comme dans la séroneutralisation des réactions sérologiques croisées en ELISA d'où l'intérêt de ne pas considérer la valeur absolue de l'IDOp mais les valeurs relatives des IDOp Peste et Pestivirus hétérologues les uns par rapport aux autres.

Le test ELISA différentiel, avec les antigènes Peste et Border Disease, a été utilisé pour détecter les anticorps chez 41 porcs expérimentalement contaminés par l'un ou l'autre des virus. Les résultats (non présentés) portant sur 759 sérums montrent que les tests ELISA Peste et Border Disease sont aussi sensibles et aussi spécifiques que les Séroneutralisation correspondantes utilisées en parallèle pour la détection des anticorps dirigés contre l'un ou l'autre virus. Il est en particulier intéressant de noter que dans les études en cinétiques, les anticorps sont détectés aussi précocement en ELISA qu'en Séroneutralisation. Les courbes de montée d'anticorps SN et ELISA sont parallèles, mais la décroissance est beaucoup plus lente en ELISA qu'en séroneutralisation. Dans le cadre de ces expérimentations il est aussi intéressant de signaler que deux porcs dont les sérums étaient négatifs en Séroneutralisation Peste (SNT < 10) et proches de la limite de positivité en ELISA (IDOp = 20), ont résisté à l'épreuve virulente avec une souche sauvage de Peste, ce qui semblerait démontrer que l'ELISA est plus sensible que la SN pour détecter des faibles taux d'anticorps dans les sérums de porcs (à publier).

S'agissant d'un test par compétition, il n'est pas nécessaire de faire des cupules témoins sérums, comme pour le test ELISA direct utilisé pour la mise en évidence des anticorps dirigés contre le virus de la maladie d'Aujeszky. Dans la pratique 44 sérums peuvent donc être testés en double sur une plaque, les 8 cupules restantes étant réservées aux sérums étalons positifs et négatifs.

CONCLUSION

La technique ELISA décrite est simple à mettre en oeuvre, rapide et économique par comparaison aux autres tests utilisés jusqu'à présent pour détecter les anticorps dirigés contre le virus de la P.P.C. et les autres Pestivirus. Elle peut donc être recommandée comme méthode alternative à la séroneutralisation dans la surveillance sérologique de la P.P.C. Tous les sérums pourraient, dans un premier temps être testés en ELISA vis-à-vis de l'antigène Peste et seuls les sérums positifs

ou douteux seraient confirmés par la séroneutralisation.

L'ELISA utilisant les antigènes Maladie des muqueuses et/ou Border Disease serait également appliquée à ces sérums pour différencier les anticorps Peste des anticorps dirigés contre les Pestivirus hétérologues, cette distinction étant particulièrement importante dans le cadre du programme d'épidémiomiosurveillance de la Peste Porcine en France.

BIBLIOGRAPHIE

- Commission of the European Communities, 1986. Third EEC Meeting on Coordination of standards and methods of diagnosis of hog cholera/classical Swine Fever between the National swine fever laboratories and harmonization of diagnostic methods. Hannover, 24-25 april, 16-24
- CORTHER C., AYNAUD J.M., GALICHER Ch., et GELFI J., 1974. Ann. Rech. Vet., 373-393
- COSTES C., PICARD M., CARNERO R., 1982. Bull. Lab. Vet., 6, 43-52
- DARBYSHIRE J.H., 1962. Res. Vet. Sci., 3, 125-128
- ESKILDSEN M., OVERBY E., 1976. Acta. Vet. Scand., 17, 131-141
- FEDIDA M., PERRIN M., PERRIN S., DURET C., SOULA A., TIXIER G., NOIRTIN C. 1986. Bull. Lab. Vet., 22, 43-59
- HAVE P., 1984. Acta. Vet. Scand., 25, 462-465
- HOLM-JENSEN M., 1981. Acta. Vet. Scand., 26, 72-80
- HOLM-JENSEN M., 1985. Acta. Vet. Scand., 26, 72-80
- LABADIE J.P., CORTHER G., AYNAUD J.M., RENAULT L., VAISSAIRE J., 1977. Bull. Acad. Vet. de France, 50, 533-542
- LAUDE H., GELFI J., 1980. Ann. Rech. Vet., 11(3), 313-319
- LEFORBAN Y., HAVE P., JESTIN A, VANNIER P., 1987. Rec. Med. Vet., 163, (6 - 7), 667-677
- LEFORBAN Y., 1988. Annual Meeting of the National Swine Fever Laboratories, Brussel, 19-20, April 1988
- SORENSEN K.J., LEI J.C., 1986. Jour. of Virolog. Methods, 13, 171-181
- TERPSTRA C., 1978. Zbl. Vet. Med. B., 25, 576-585
- VANNIER P., CARNERO R., LAUDE H., 1984. Proc. 8th I.P.V.S. Congress, Ghent, Belgium, August, 27-31
- VANNIER P., 1985. Am. J. Vet. Res., 46, 1498-1502
- VANNIER P., CARNERO R., 1985. Le Point Vétérinaire, 17, 90.

ANNEXE

BDV	: Border Disease Virus	HCV	: Hog Cholera virus ou virus de la Peste Porcine Classique
BVD	: Bovine Viral Diarrhea ou Diarrhée Virale Bovine	MD	: Mucosal Disease ou Maladie des Muqueuses
CV	: Coefficient de variation	NIF	: Neutralisation révélée par Immunofluorescence
DIF 50	: Dose Infectieuse Fluorescente 50 %	OPD	: OrthoPhénylène Diamine
DO	: Densité Optique	PPC	: Peste Porcine Classique
DOp	: Pourcentage de Densité Optique	SN	: Séroneutralisation
IDOp	: Pourcentage d'inhibition de Densité Optique	SNT	: titre neutralisant
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	SPP	: Station de Pathologie Porcine
EOPS	: Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique	TN	: Titre neutralisant