

# Développement d'un test sérologique pour différencier les anticorps post-infection / post-vaccination contre le virus de la fièvre aphteuse

## Developpement of the FMDV serological test for differentiating infectious and vaccinated animals

BAKKALI KASSIMI L., KAISER C., REMOND M., LEBRETON F., ZIENTARA S.

UMR1161 INRA/AFSSA/ENVA, Unité maladies émergentes, AFSSA-Lerpaz, 23 Av du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France

### INTRODUCTION

La détection des animaux infectés après une vaccination d'urgence dans les pays indemnes de fièvre aphteuse constitue une mesure de contrôle importante. En effet, les animaux exposés à l'infection (naïfs ou vaccinés) peuvent rester porteurs du virus après le contact infectieux et représentent donc un risque au niveau épidémiologique. La différenciation entre les animaux infectés et les animaux vaccinés est principalement basée sur la réponse humorale vis-à-vis des protéines non-structurales (NS) du virus. Notre objectif est de développer un test ELISA pour la détection spécifique des anticorps anti-protéines non-structurales. Nous avons cloné le gène 3D (ARN polymérase) du virus aphteux (virus de sérotype O isolé en France lors de l'épizootie de 2001) (Nobiron *et al.*, 2005) en baculovirus, exprimé la protéine en cellules d'insectes et évalué son utilisation comme antigène dans un test ELISA.

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. EXPRESSION DE LA PROTEINE 3D

La séquence complète du gène 3D a été clonée en baculovirus en utilisant le système d'expression BAC-to-BAC (Invitrogen)

La protéine a été exprimée dans des cellules d'insectes Sf9 et sa production vérifiée par *Western Blot* à l'aide d'anticorps monoclonaux.

#### 1.2. ELISA

Une adaptation du test ELISA indirect d'immunocapture (De Diego *et al.*, 1997) a été utilisée. L'antigène 3D est fixé au fond des cupules à l'aide d'un anticorps monoclonal. Après réaction des sérums à tester, le complexe anticorps antigène est révélé par un anticorps anti-espèce couplé à la peroxydase.

Des sérums de référence AFSSA et des sérums de bovins naïfs (France) ont été utilisés pour la mise au point du test.

#### 1.3. VALIDATION DU TEST

Des sérums de bovins infectés (I), vaccinés (V) ou vaccinés puis infectés (V+I) issus du panel de la phase 18 (FAO phase XVIII FMD *serological standardisation*) ont été analysés. Les résultats obtenus avec l'ELISA 3D ont été comparés aux valeurs obtenues avec un test ELISA commercialisé (Ceditest 3ABC).

### 2. RESULTATS

#### 2.1. EXPRESSION DE LA PROTEINE 3D

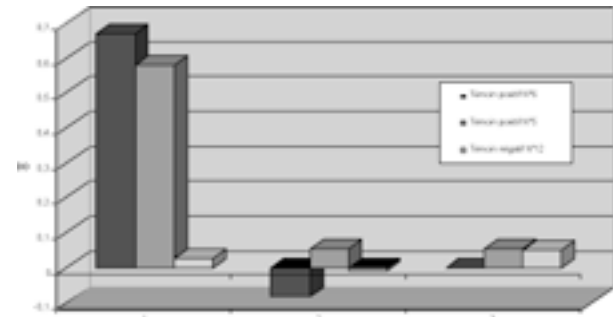
Des extraits de cellules d'insectes infectées par le baculovirus recombinant ont été analysés par *Western Blot* à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-histidine et anti-3D. L'analyse montre que la protéine 3D est bien produite dans les cellules et qu'elle est reconnue par l'anticorps anti-histidine et par les anticorps anti-3D.

#### 2.2. MISE AU POINT DE L'ELISA

Après optimisation des différents paramètres du test ELISA, les anticorps anti-3D (a) ont pu être détectés spécifiquement (figure 1) dans des sérums de référence positifs (EIL N°5 et

EIL N°6). Le sérum issu d'un animal naïf (EIL N° 12) ne réagit pas avec l'antigène 3D. Aucune réponse non spécifique n'est obtenue avec des antigènes de contrôle (b : extraits de cellules Sf9 non infectées et c : extraits de cellules Sf9 infectées par le virus sauvage).

Figure 1 : ELISA 3D avec des sérums de référence



#### 2.3. VALIDATION DU TEST

Les résultats obtenus avec l'ELISA 3D (figure 2) concordent à 91,6 % avec ceux obtenus avec le Ceditest 3ABC et reflètent bien le statut des animaux excepté pour le sérum 12 (trouvé négatif en ELISA 3D après 3 essais).

Figure 2 : Validation du test

N°sérum	Source Virus/FA	Statut	Signes cliniques	SI	3D ELISA Valeur DO	Résultats	3ABC ELISA (OD et % inhibition)	Résultats
1	Aks 1 Shamr	V+I	actif	1/112	0,048	négatif	31	négatif
2	Bovin adulte	naïf	naïf	naïf	0,059	négatif	16	négatif
3	O UKG 3401	V	actif	1/2	1,112	négatif	11	négatif
4	A34 Ouzers	I	FJM	1/60	0,026	positif	30	positif
5	Aks 1 Shamr	V+I	actif	1/60	0,11	négatif	28	négatif
6	Aks 1 Shamr	V+I	actif	1/60	0,53	positive	50	positif
7	A34 Ouzers	I	FJM	1/20	0,39	positif	36	positif
8	Bovin adulte	naïf	naïf	naïf	0,011	négatif	17	négatif
9	O UKG 3401	I	FJM	1/20	0,18	borderline	36	positif
10	A34 Ouzers	I	FJM	1/27	0,479	positive	100	positif
11	Bovin adulte	naïf	naïf	naïf	0,016	négatif	20	négatif
12	O UKG 3401	I	FJM	1/51	0,053	négatif	34	positif

### 3. DISCUSSION

La protéine 3D a été produite dans des cellules d'insectes à l'aide d'un système d'expression en baculovirus. La protéine a gardé son antigénicité puisqu'elle est reconnue par des anticorps monoclonaux spécifiques et des sérums de bovins infectés. Les tests de validation de l'ELISA réalisés avec un échantillon de sérums de référence ont montré que le test ELISA 3D permettait dans une majorité de cas par comparaison avec un autre test ELISA détectant les anticorps contre les protéines non-structurales 3ABC, la détection des animaux infectés.

### 4. CONCLUSION

Ces résultats indiquent la possibilité d'utiliser la protéine 3D comme antigène de diagnostic dans un test ELISA non spécifique de type pour l'identification d'animaux infectés.

Nobiron *et al.* 2005. *Virus Res*, 108, 225-229

De Diego *et al.* 1997. *Arch Virol*, 142 (10), 2021-2033