



44ème Journée de la Recherche Équine
Jeudi 15 mars 2018

Développement d'un Test DIVA pour la détection sérologique du virus West Nile chez le cheval

C. Beck¹, S. Pradier², I. Desjardin³, A. Joulié^{3,4,5}, L. Vial⁶, A. Leblond^{3,5}, S. Lecollinet¹

¹ Université Paris Est, UMR 1161 Virologie, ANSES, INRA, ENVA, ANSES Laboratoire de Santé Animale, LRUE maladies équinés, 94700 Maisons-Alfort, France

² IHAP Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31300 Toulouse, France

³ Université de Lyon, VetAgroSup, 69280 Marcy-L'Étoile, France

⁴ INRA, 63122 Saint-Genès Champanelle, France,

⁵ ANSES Laboratoire de Sophia-Antipolis, 06902 Sophia-Antipolis, France

⁶ CIRAD, UMR CMAEE, 34398 Montpellier, France

Résumé

Avec 41 cas de formes neuroinvasives dans la population équine, la France a fait face en 2015 à une intense circulation du virus West Nile (WNV) en région Camargue, conduisant à la vaccination des chevaux contre cette maladie. Le cheval étant une sentinelle de l'infection, la mise en place d'un test sérologique permettant de distinguer les chevaux vaccinés contre le WNV de ceux infectés naturellement (DIVA) est primordiale. Une enquête sérologique a été effectuée en 2016 sur 289 chevaux dont 36 chevaux vaccinés avec le vaccin inactivé et adjuvé Equip[®] WNV et 18 avec le vaccin recombinant Proteq[®] West Nile. Les sérums ont été testés par la méthode d'immuno-essais sur billes (MIA), comprenant 2 billes couplées respectivement à la glycoprotéine d'enveloppe (WNV.sE) et à la protéine non structurale (WNV.NS1) du WNV. Nos résultats suggèrent que le vaccin Equip[®] WNV induit une réaction humorale anti-E et anti-NS1 fortes et durables. À l'inverse, les chevaux vaccinés avec le Proteq[®] West Nile présentent une réponse anticorps anti-E d'intensité modérée mais aucune réponse anti-NS1 permettant un test DIVA uniquement pour ce vaccin.

Mots clés : Virus West Nile, test DIVA, immuno-essais sur billes (MIA)

Summary

In 2015, with 41 cases of neuroinvasive forms in the equine population, France faced an intense circulation of the West Nile virus (WNV) in the Camargue region leading to the vaccination of horses against this disease. Since the horse is a sentinel for the infection, the establishment of a serological test to distinguish horses vaccinated against WNV from those infected naturally (DIVA) is essential. With this in mind, a serological survey carried out in 2016 on 289 horses including 36 horses vaccinated with the inactivated and adjuvanted Equip[®]WNV vaccine and 18 with the recombinant Proteq[®] West Nile vaccine. The sera were assayed by a microsphere immunoassay (MIA), comprising 2 beads coupled to envelope glycoprotein (WNV.sE) and non-structural protein (WNV.NS1) of WNV. Our results suggest that the Equip[®] WNV vaccine induces a strong and lasting anti-E and anti-NS1 humoral reaction. In contrast, horses vaccinated with Proteq[®] West Nile have a moderate anti-E antibody response but no anti-NS1 response allowing the establishment of a DIVA test only for this vaccine.

Key-words: West Nile virus, DIVA test, microsphere immuno-assay (MIA)



Introduction

L'infection à virus West Nile (WNV) est une maladie virale, transmise par la piqûre de moustiques infectés du genre *Culex*. Le virus est amplifié selon un cycle moustique-avifaune-moustique et peut être inoculé au Cheval ou à l'Homme. De par son caractère zoonotique, la sévérité des infections chez l'Homme et le Cheval et le risque de transmission interhumaine par transfusion sanguine, la fièvre West Nile est un danger sanitaire de première catégorie. L'infection à virus West Nile a été rapportée en Camargue dès les années 1960 avant d'enregistrer 40 ans plus tard de nouveaux cas dans l'Hérault (2000), le Var (2003), les Bouches-du-Rhône (2004), le Gard (2004) et enfin les Pyrénées-Orientales (2006) (Lecollinet S, Lefrançois T *et al.* 2008). En 2015, la France a fait face à une nouvelle épizootie dans la population équine en région Camargue. Entre août et octobre 2015, 72 cas suspects (chevaux avec des signes neurologiques) ont été comptabilisés, conduisant à la confirmation de 41 cas de maladie neuro-invasive à WNV et à 31 cas infirmés (Bahuon, Marcillaud Pitel *et al.* 2016). Trois cas de formes fébriles et cinq infections asymptomatiques ont par ailleurs été diagnostiquées, provenant soit du dépistage systématique organisé sur les équidés des premiers foyers ou d'enquêtes rétrospectives aux alentours des foyers. De plus une forme fébrile humaine a été diagnostiquée dans la ville de Nîmes.

Cette intense circulation du WNV dans la population équine en région Camargue a conduit les propriétaires à la vacciner contre cette maladie dans certaines écuries. Cependant, le cheval étant une sentinelle de l'infection, la distinction entre anticorps vaccinaux et non vaccinaux est primordiale pour interpréter les résultats de la surveillance.

L'objectif de ce travail a donc été de mettre en place un test sérologique permettant de distinguer les chevaux vaccinés contre le WNV de ceux infectés naturellement (test DIVA pour Differentiating Infected from Vaccinated Animals). Dans ce but, une enquête sérologique au printemps 2016 sur 289 chevaux de la région Camargue a été conduite en ciblant en particulier les écuries ayant eu recours à un des trois vaccins commercialisés pour lutter contre la fièvre West Nile.

Cet article présente les résultats de l'enquête sérologique avec un focus sur la réponse anticorps anti-WNV induite par les différents vaccins. Les conséquences de cette réaction humorale pour la validation d'un test DIVA basé sur une protéine non structurale (NS1), qui est immunogène mais absente du virion mature, sont ensuite analysées.

1 Matériel et méthode

1.1 Collecte des échantillons

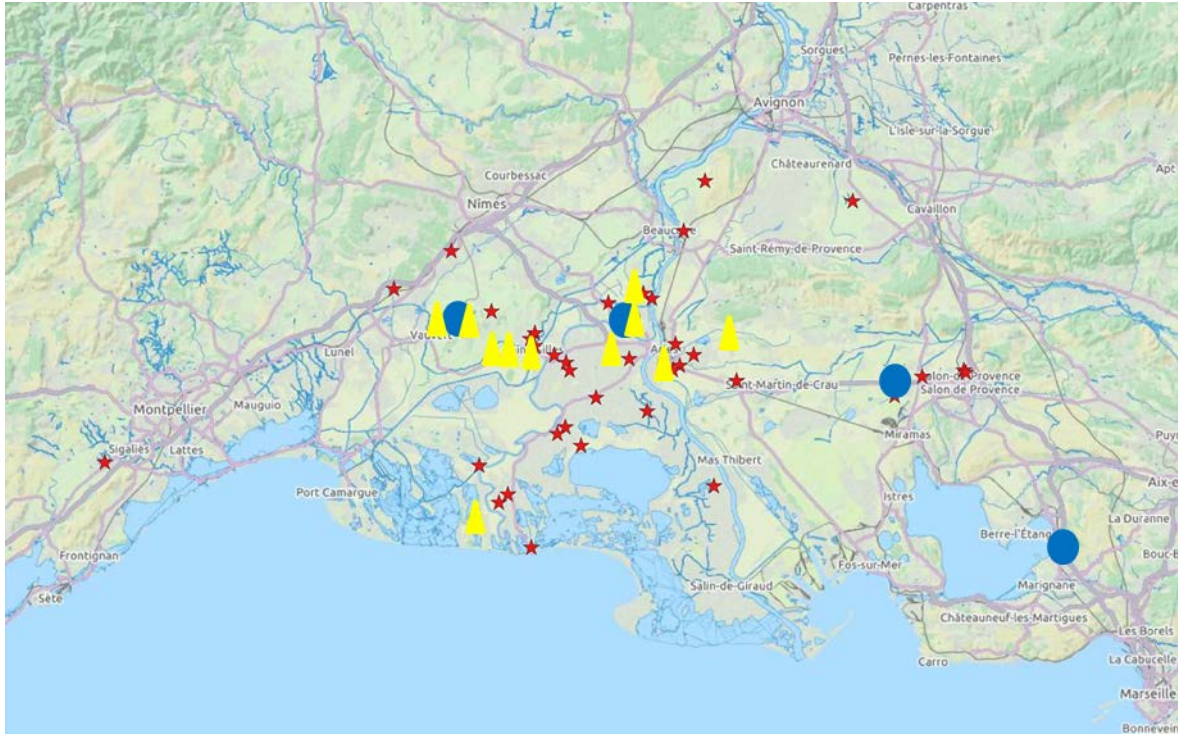
La plupart des foyers de l'épizootie 2015 étaient situés en Camargue, à la limite entre les départements des Bouches-du-Rhône et du Gard, dans une zone d'une soixantaine de kilomètres de diamètre. L'enquête sérologique 2016 a donc été centrée sur cette zone en privilégiant les écuries ayant vacciné contre le WNV.

Au total 289 chevaux ont été prélevés dans 43 écuries avec 36 chevaux vaccinés avec le vaccin inactivé Equip®WNV de la firme Zoétis et 18 avec le vaccin recombinant Proteq®West Nile de la firme Merial. Aucun cheval n'a été vacciné avec le vaccin Equilis®West Nile d'Intervet à la suite de l'épizootie WNV 2015 (Figure I).



Figure I : Cas équins de WNV en 2015 (étoile rouge) et écuries ayant vacciné avec le vaccin Merial (rond bleu) ou Zoétis (triangle jaune)

Figure I: Equine WNV cases in 2015 (red star) and stables vaccinated with Merial vaccine (blue round) or Zoetis (yellow triangle)



1.2 ELISA

Un test sérologique a été réalisé sur les 289 sérums en utilisant un ELISA de compétition (ID Screen® West Nile Competition ELISA kit, ID Vet, Montpellier, France) qui détecte les anticorps dirigés contre la glycoprotéine E du WNV.

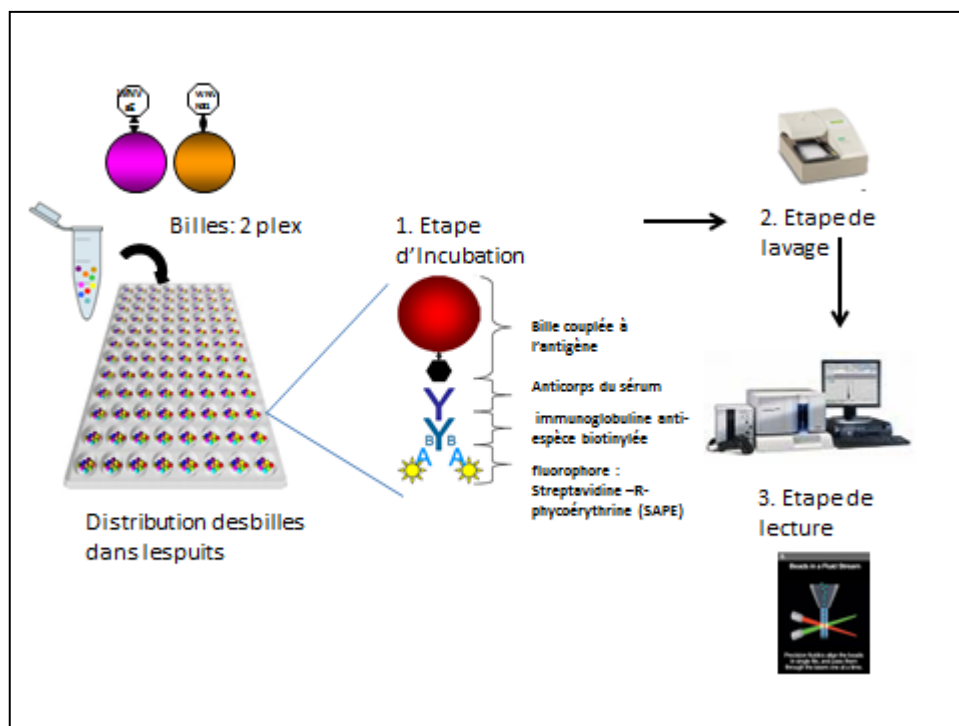
Les essais ont été réalisés suivant les instructions du fabricant. Le seuil de positivité pour cet ELISA de compétition correspondait à un % S/N < 40% et les sérums étaient considérés comme douteux pour $40\% \leq \% S/N < 50\%$ comme recommandé par le fabricant.

1.3 Méthode multiplexe

Une sélection de chevaux non vaccinés et positifs en ELISA de compétition WNV (chevaux infectés pendant l'épizootie 2015 ou les épizooties précédentes enregistrées en région Camargue en 2000 et 2004) et l'ensemble des chevaux vaccinés ont ensuite été testés par méthode MIA.

Cette technique MIA a été dessinée afin de différencier les chevaux infectés naturellement par le virus West Nile (WNV) de ceux vaccinés. Deux antigènes, la partie soluble de la glycoprotéine d'enveloppe du WNV (WNV.sE), souche Israël 1998 (Genbank AY033389.1 ; AA 1 à 405) et l'antigène recombinant NS1 du WNV (WNV.NS1), souche Egypte 101 (Genbank: EU081844.1 ; AA 793-1143) aimablement fourni par Natalie Cleton (Cleton, van Maanen *et al.* 2016) ont été couplés aux billes et testés en MIA suivant la méthode décrite dans l'article de C. Beck *et al.* (Beck, Despres *et al.* 2015) (Figure II).

Figure II : Présentation de la méthode MIA
 Figure II : Presentation of the MIA method



Distribution de billes codées couplées aux antigènes WNV.sE et WNV.NS1 et mises en contact avec le sérum à tester et avec des anticorps secondaires anti-espèces (anti-cheval) marqués à la biotine. La fixation des anticorps sur les billes est révélée par l'ajout du fluorophore Streptavidine-R-phycoérythrine (SAPE). A l'étape de la lecture, l'intensité de fluorescence et le code couleur de la bille sont mesurés par deux lasers qui excitent les billes à 2 longueurs d'onde différentes (635 nm pour identifier la microsphère et donc l'antigène fixé et 532 nm pour mesurer la fluorescence de la SAPE et donc l'intensité de fixation du sérum équin sur la bille). Pour chaque sérum, la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) est calculée pour au moins 50 billes portant le même antigène.

Théoriquement, les équidés infectés ou vaccinés développent systématiquement une réponse anti-WNV.sE alors qu'une réponse humorale anti-WNV.NS1 ne devait être mesurée que chez des équidés naturellement infectés.

2 Résultats

2.1 Résultats ELISA

Sur les 235 chevaux non vaccinés de l'étude 2016, 40 chevaux ont été trouvés porteurs d'anticorps anti-WNV avec le kit ELISA de compétition WNV. Ce résultat sérologique positif est la signature soit d'une infection au cours de la dernière épizootie de 2015, soit d'une infection plus ancienne. Il a été possible de dater plus précisément l'infection chez les équidés jeunes, soit chez 20 chevaux nés après 2006 (infection plus probablement acquise lors de l'épizootie de 2015).

Concernant les vaccinés, seuls 54 chevaux ont pu être inclus dans l'enquête, suggérant un faible recours à la vaccination West Nile. Les chevaux vaccinés pendant l'épisode 2015 appartenaient à des écuries ayant enregistré des cas neuro-invasifs graves en début d'épizootie ou avec des chevaux de haute valeur (reproduction, spectacle...).

Au sein des écuries vaccinées, les 36 chevaux vaccinés avec le vaccin Zoétis ont été trouvés positifs en ELISA de compétition quel que soit le délai entre la seconde injection de primovaccination et le prélèvement (tableau 1). En revanche concernant les chevaux vaccinés avec le vaccin Merial, 11 chevaux ont été trouvés positifs, trois douteux et quatre négatifs en ELISA. Parmi les sept chevaux trouvés négatifs ou douteux, deux chevaux (un négatif et un douteux) n'avaient reçu qu'une seule injection de primo-vaccination (primo-vaccination incomplète) avant la prise de sang. Les trois autres chevaux négatifs en ELISA avaient été vaccinés plus de six mois avant la réalisation du prélèvement. Le tableau 1 résume les résultats obtenus sur les chevaux vaccinés en fonction du vaccin et du délai entre seconde injection de primo-vaccination et prise de sang.



Tableau 1 : Résultats ELISA (kit ID Screen® West Nile competition) obtenus sur des chevaux vaccinés avec les vaccins Proteq® West Nile (Merial) ou Equip® WNV (Zoétis)

Table 1: ELISA results (ID Screen® West Nile competition kit) obtained on horses vaccinated with Proteq® West Nile (Merial) or Equip® WNV (Zoétis)

Vaccins	Résultats ELISA (ID Vet)	Résultats ELISA en fonction du délai entre la 2 ^{de} injection de primovaccination et la prise de sang (jours)			
		0-30	30-90	90-180	180-270
Vaccin Merial					
Positif	11	1	2	2	6
Douteux	2			1	1
Négatif	3				3
Total vaccin Merial	16*	1	2	3	10
Vaccin Zoétis					
Positif	36	8	9	2	17
Total vaccin Zoétis	36	8	9	2	17
Total général	52	8	11	5	27

Les résultats sont exprimés en fonction du délai entre 2^{de} injection de primovaccination et la prise de sang

* 2 chevaux vaccinés Merial n'apparaissent pas dans ce tableau car ils n'avaient reçu qu'une seule injection de primo-vaccination (protocole de primo-vaccination incomplet).

2.2 Résultats avec la méthode MIA

2.2.1 Calcul du seuil de positivité pour la bille NS1

Le seuil de positivité pour l'antigène E a été fixé lors d'une étude antérieure (Beck, Despres *et al.* 2015). Le seuil de positivité pour l'antigène NS1 a été déterminé par analyse des courbes ROC sur un panel de 31 sérums trouvés positifs et 44 négatifs par ELISA de compétition WNV (ID Screen® West Nile competition kit). Un contrôle positif a été systématiquement inclus dans chaque essai et les résultats de fluorescence obtenus pour les billes WNV.sE et WNV.NS1 ont été normalisés selon le ratio S/CP x100. Un seuil respectivement de 17 et de trois pour le ratio S/CPx100 ont été calculés pour les billes WNV.sE (Se=98,4% ; Sp= 99,4%) et WNV.NS1 (Se de 93,5% et Sp de 97,7%).

La bille NS1 montre donc une très bonne spécificité mais une sensibilité inférieure à celle trouvée avec la bille WNV.sE.

2.2.2 Résultats avec la méthode MIA

33 chevaux infectés naturellement par WNV ont été testés par méthode MIA et trouvés positifs à 100% (33/33), et à 91% (30/33) avec les billes WNV.sE et WNV.NS1 respectivement.

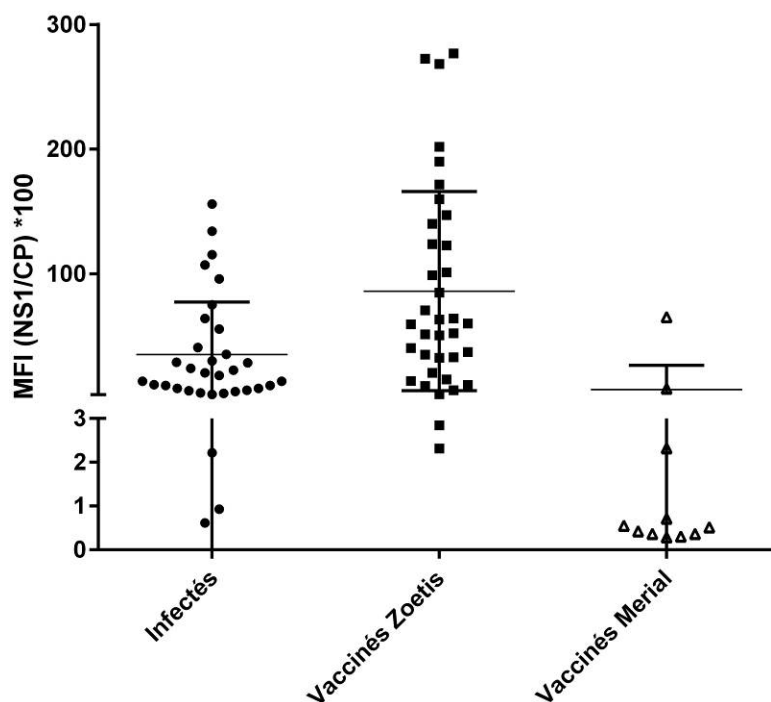
Après vaccination, les 36 chevaux vaccinés avec le vaccin Equip® WNV (Zoétis) ont été trouvés positifs avec les billes WNV.sE (100%) et 34 avec la bille WNV.NS1 (94%) (Fig 3).

Dans le groupe des 11 chevaux vaccinés avec le vaccin Proteq® West Nile (Merial) et positifs avec l'ELISA ID Screen® West Nile compétition, 100% (11/11) ont été trouvés positifs avec la bille WNV.sE et 18% (2/11) avec la bille WNV.NS1 (Figure III).



Figure III : Représentation des résultats de fluorescence MIA de la bille WNV.NS1 pour les chevaux infectés naturellement et vaccinés respectivement avec le vaccin Zoétis et Merial.

Figure III: WNV.NS1 MIA fluorescence results for horses naturally infected or vaccinated with the Zoetis or Merial vaccines



Seuil de positivité de la bille WNV.NS1 = 3 ; Valeurs de fluorescence exprimées comme le ratio du MFI de l'échantillon sur le MFI du contrôle positif X 100 (S/CPX100)

Les deux chevaux positifs avec la bille WNV.NS1 et vaccinés avec Proteq® West Nile (Merial) se trouvaient dans une unique écurie où un cheval a développé une forme neuro-invasive à WNV en 2015. On peut donc fortement suspecter que ces deux chevaux positifs ont développé une réponse anti-NS1 WNV suite à une infection asymptomatique à WNV en 2015.

Enfin dans le groupe des sept chevaux vaccinés avec Proteq® West Nile (Merial) et négatifs ou douteux avec le kit ELISA ID Screen® West Nile competition, 57 % (4 / 7) ont été trouvés « positifs » avec la bille WNV.sE (résultat considéré douteux car au seuil de positivité de la bille) et 0% avec la bille WNV.NS1.

3 Discussion et conclusion

Les résultats de notre enquête séro-épidémiologique sur les chevaux vaccinés en zone Camargue suite à l'épizootie WNV de 2015 montrent que la vaccination avec le vaccin inactivé et adjuvé Equip® WNV de la firme Zoétis induit une réaction humorale anti-WNV forte et durable. En revanche la réponse anticorps induite par le vaccin canarypox adjuvé (Proteq® West Nile de la firme Merial) apparaît d'intensité plus modérée et transitoire, comme décrit précédemment par Khatibzadeh *et al* (Khatibzadeh, Gold *et al.* 2015). Cependant, El Garche *et al* ont pu démontrer l'induction d'une réponse cellulaire spécifique contre le WNV suite à la vaccination de chevaux avec le vaccin recombinant canarypox WNV (El Garch, Minke *et al.* 2008). Cette réponse cellulaire est fondamentale pour l'élimination du virus et la protection contre le WNV. Il est néanmoins difficile d'objectiver avec les tests de routine pratiqués en laboratoire, la durée de protection induite par cette réponse cellulaire.

Les protéines non structurales sont des protéines candidates intéressantes pour la mise au point de tests DIVA WNV car elles ne sont pas présentes dans le virion. La protéine NS1 du WNV entraîne de plus une réponse humorale forte et représente donc un antigène de choix.



Cependant dans notre étude, la réponse contre l'antigène NS1 ne permet pas de différencier les chevaux vaccinés avec le vaccin inactivé de Zoétis des chevaux infectés WNV. Ces résultats montrent que le procédé de purification de ce vaccin inactivé n'élimine pas complètement la protéine NS1 présente sur les membranes cellulaires et/ou dans le surnageant. Cette difficulté ne semble pas exister avec les vaccins inactivés contre l'encéphalite japonaise, un autre flavivirus infectant les chevaux et présent en Asie du Sud-Est où une distinction entre chevaux vaccinés et chevaux infectés peut être réalisée avec un ELISA anti-NS1 (Konishi, Shoda *et al.* 2004).

A l'inverse, le test MIA avec l'antigène NS1 WNV distingue correctement les chevaux vaccinés avec le vaccin recombinant West Nile commercialisé par Merial de ceux infectés naturellement et permet au final de distinguer les chevaux infectés des chevaux vaccinés avec un vaccin recombinant n'exprimant pas l'antigène NS1. Cette distinction est essentielle si on veut maintenir le cheval comme sentinelle de l'infection en zone vaccinée et pousse à poursuivre le développement des vaccins recombinants ou sous-unitaires ou à améliorer les procédés de purification des vaccins inactivés contre le WNV.

Remerciements

Cette étude a été financée par l'IFCE et les fonds Eperon. Nous tenons à remercier l'ensemble des propriétaires de chevaux et des vétérinaires qui ont accepté de participer à ce projet.

Références

- Bahuon, C., C. Marcillaud Pitel, L. Bournez, A. Leblond, J. Hars, C. Beck, I. Leparç Goffart, G. L'Ambert, M. C. Paty, L. Cavalerie, C. Daix, P. Tritz, B. Durand, S. Zientara and S. Lecollinet (2016). "WNV epizootics in Camargue, France, 2015 and reinforcement of WNV surveillance and control networks." O.I.E Bulletin épidémiologique
- Beck, C., P. Despres, S. Paulous, J. Vanhomwegen, S. Lowenski, N. Nowotny, B. Durand, A. Garnier, S. Blaise-Boisseau, E. Guitton, T. Yamanaka, S. Zientara and S. Lecollinet (2015). "A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses." Biomed Res Int 2015: 678084.
- Cleton, N. B., K. van Maanen, S. A. Bergervoet, N. Bon, C. Beck, G. J. Godeke, S. Lecollinet, R. Bowen, D. Lelli, N. Nowotny, M. P. Koopmans and C. B. Reusken (2016). "A Serological Protein Microarray for Detection of Multiple Cross-Reactive Flavivirus Infections in Horses for Veterinary and Public Health Surveillance." Transbound Emerg Dis.
- El Garch, H., J. M. Minke, J. Rehder, S. Richard, C. Edlund Toulemonde, S. Dinic, C. Andreoni, J. C. Audonnet, R. Nordgren and V. Juillard (2008). "A West Nile virus (WNV) recombinant canarypox virus vaccine elicits WNV-specific neutralizing antibodies and cell-mediated immune responses in the horse." Vet Immunol Immunopathol 123(3-4): 230-239.
- Khatibzadeh, S. M., C. B. Gold, A. E. Keggan, G. A. Perkins, A. L. Glaser, E. J. Dubovi and B. Wagner (2015). "West Nile virus-specific immunoglobulin isotype responses in vaccinated and infected horses." Am J Vet Res 76(1): 92-100.
- Konishi, E., M. Shoda, N. Ajiro and T. Kondo (2004). "Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses." J Clin Microbiol 42(11): 5087-5093.
- Lecollinet S, Lefrançois T, Durand B, Leblond A, Dauphin G, de Goer J and Z. S. (2008). "Surveillance de l'infection équine à virus West Nile en France. Bilan 2000-2007." Epidémiologie et santé animale 54: 69-80.