Discussion posters SESSION1/ N° 81

Recherche d'anticorps salivaires anti-CMV de type IgA pour apprécier l'immunité muqueuse anti CMV

Alain S., Cazal R., Grosjean J., Saade F., Hantz S., Ploy M.C

Centre National de Référence des Cytomégalovirus, Virologie, UMR Inserm 1092, Université de Limoges, France.

Introduction

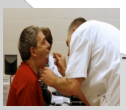
L'importance de l'infection à CMV en santé publique (première cause d'infection congénitale virale) et en transplantation fait de ce virus une priorité vaccinale. A ce jour les essais de vaccination utilisant la glycoprotéine B d'enveloppe, cible majeure d'ancticorps neutralisants,confèrent une protection chez la moitié des femmes. Un effort pour développer de nouvelles stratégies vaccinales est donc essentiel. L'immunité muqueuse est particulièrement importante dans la défense contre les infections virales à contage respiratoire ou salivaire.

Objectifs

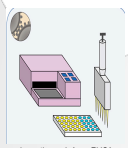
Disposer d'un test permettant de détecter les IgA salivaires anti CMV, voire les quantifier permettrait d'évaluer l'immunité locale au site de l'infection, après vaccination. Cette méthode non invasive a été proposée par Adler et al. dès 1996 au cours des primo-infections de l'enfant, pour la recherche des IgG.
Notre objectif est de proposer un test évaluant la réponse spécifique vis à vis du CMV au niveau des muqueuses, chez l'enfant ou chez l'adulte, y compris après vaccination.

Méthodes

. Un premier test ELISA IgA et IgG a été optimisé à partir de gB recombinante (Biodesign) basée sur la séquence de la gB de la souche de référence Towne.
Ce est a été utilisé pour étudier la réponse anticorps en comparaison au taux d'IgG sériques anti-CMV (Siemens Enzygnost) dans deux populations
-exposée : puéricultrices et infirières des urgences de pédiatrie
-peu exposée: volontaires sains et personnel de laboratoire
. Afin d'améliorer la spécificité du test un deuxième ELISA a été optimisé à partir de gB vaccinale (don de Sanofi Pasteur) pour une quantification des IgG et des IgA salivaires en utilisant comme standard une IgA de souris anti gB humanisée (B Cell Design)



Conservation à -80°C en présence d'anti-protéases



Dosage des anticorps IgA par ELISA sur plaques coatées avec la protéine gB du CMV

Recueil de la salive:

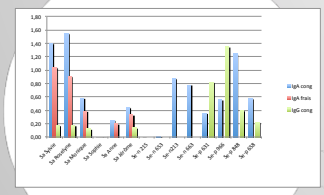
•A l'aide d'écouvillons mis pendant 30 sec dans la bouche (quantités recueillies ~ 100µl), dans 300µl de diluant (Enzygnost; Siemens; Ref 426714) contenant 0,1% d'anti-protéases (Halt Protease Inhibitor Single use cocktail; Thermo Scientific Ref: 78430)
•Centrifugation de la salive 15min, 10K, 4°C

Protocole ELISA :

J-1 Coating de la gB
J0 saturation en BSA1%
Incubation des dilutions de salive en BSA1%/PBS
Incubation avec l'anticorps secondaire anti IgA ou IgG de chèvre (Beckman Coulter) conjugués à la phosphatase alcqline au 1/1OOO en BSA 0,3%
Révélation en PNPP
Lecture 405nm
(lavages en PBS Tween 0,1%)

Résultats

Détermination semi-quantitative par ELISA des anticorps IgA (salive fraiche ou congelée) et IgG dans la salive et les sérums

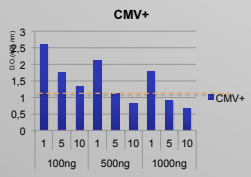


Salive: Niveaux IgA détectés dans salive congelée > Salive fraiche: probablement IgA libérés des complexes immuns lors de la congélation/décongélation
Taux IgG faibles dans la salive
Sérums: IgG détectés dans le sérum de 2 patients CMV - (manque de spécificité=> tester la gB vaccinale)

Détermination des conditions optimales de l'ELISA IgA (gB coatée, dilution) et de la spécificité des anticorps détectés

Le témoin pool positif (CMV+) a été fait à partir des salives de 3 personnes séropositives vis à vis du CMV

gB coatée	Dilution salive
100ng	1
	5
	10
500ng	1
	5
	10
1000ng	1
	5
	10



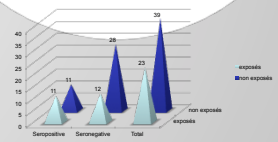
Corrélation entre la sérologie, le dosage IgG (trousse ETI Mak CMV DiaSorin sans dilution, 50uL) et IgA (anti gB) dans la salive de volontaires sains (étude ACMV)

Anonymat	Numéro	Serologie	Salive (IgG routine)	DO (IgA ci)	Centre
6CD1F54	1	<230	0,123	0,2	Laboratoire de Bactériologie
V0D3F96	2	5800	0,109	0,12	Laboratoire de Bactériologie
HND3F68	3	<230	0,086	0,19	Laboratoire de Bactériologie
LAA04F61	4	2300	0,114	0,31	Laboratoire de Bactériologie
G205M80	5	<230	0,12	0,3	Laboratoire de Virologie
B2D0F75	6	<230	0,084	0,18	Laboratoire de Virologie
BQ0F69	7	<230	0,111	0,61	Laboratoire de Virologie
AJ08F70	8	5800	0,09	1,01	Laboratoire de Virologie
H50MF75	9	<230	0,12	0,42	Laboratoire de Virologie
BR10F52	10	11500	0,408	0,16	Laboratoire de Virologie
BV11F63	11	1700	0,138	0,33	Laboratoire de Virologie
TA12F69	12	<230	0,109	1,01	Laboratoire de Virologie
FN13F82	13	<230	0,214	2,48	Laboratoire de Virologie
S1J4F63	14	<230	0,091	0,14	Laboratoire de Virologie
TM13F50	15	2300	0,322	0,35	Laboratoire de Virologie
VM16F85	16	<230	0,16	0,28	Laboratoire de Virologie
BA13F52	17	<230	0,157	0,24	Laboratoire de Virologie
DV18F79	18	<230	0,17	0,55	Laboratoire de Virologie
CE1SF81	19	<230	0,15	0,47	Laboratoire de Bactériologie
DA20F84	20	<230	0,126	0,61	Laboratoire de Bactériologie
FA21KF9	21	<230	0,137	0,53	Laboratoire de Bactériologie
CD22F29	22	<230	0,172	0,08	Laboratoire de Bactériologie
HP24F68	23	2300	0,124	0,38	Laboratoire de Bactériologie
HP24F68	24	<230	0,124	0,35	Laboratoire de Bactériologie
GA26F56	25	<230	0,141	0,41	Laboratoire de Bactériologie
GA28F56	26	2300	0,181	0,49	Urgences Pédiatriques
BV29F72	27	<230	0,132	0,41	Urgences Pédiatriques
SA30F67	28	2300	0,126	0,54	Urgences Pédiatriques
AJP31M66	31	<230	0,091	0,36	Urgences Pédiatriques
AP33M54	32	<230	0,143	0,38	Urgences Pédiatriques
RF31F63	33	4100	0,34	0,11	Urgences Pédiatriques
PC34F73	34	4100	0,181	0,09	Urgences Pédiatriques
MS33F75	35	<230	0,258	0,19	Urgences Pédiatriques
QC36F84	36	<230	0,092	0,28	Urgences Pédiatriques
TS37F71	37	2300	0,127	0,18	Urgences Pédiatriques
LC38F78	38	<230	0,104	0,17	Urgences Pédiatriques
LL39F85	39	<230	0,127	0,13	Urgences Pédiatriques
BS40F79	40	<230	0,177	0,07	Urgences Pédiatriques
FA41F65	41	<230	0,149	0,09	Urgences Pédiatriques
GA42F61	42	<230	0,141	0,23	Laboratoire de Bactériologie
BM43F61	43	<230	0,168	1,04	Laboratoire de Bactériologie
AS45F62	47	<230	0,108	0,39	Laboratoire de Virologie
SH8F54	49	2300	0,195	0,22	Laboratoire de Virologie
BR50F85	50	<230	0,143	0,42	Laboratoire de Virologie
LV51F73	51	<230	0,086	0,52	Laboratoire de Virologie
CF52F83	52	2300	0,18	0,11	Laboratoire de Bactériologie
BMC53E68	53	<230	0,164	0,33	Laboratoire de Bactériologie
IT54M62	54	<230	0,097	0,08	Laboratoire de Bactériologie
BC55F55	55	2300	0,149	0,17	Laboratoire de Bactériologie
DO56F87	56	<230	0,084	0,06	Laboratoire de Bactériologie
GN57F74	57	2300	0,105	0,2	Urgences Pédiatriques
SR58F95	58	2300	0,155	0,4	Urgences Pédiatriques
AC59F79	59	<230	0,102	0,17	Urgences Pédiatriques
BG60F85	60	2300	0,231	0,22	Urgences Pédiatriques
RH61F86	61	<230	0,083	0,27	Urgences Pédiatriques
CC62F83	62	<230	0,087	0,22	Urgences Pédiatriques
FD63F83	63	<230	0,087	0,28	Urgences Pédiatriques
BS64F72	64	2300	0,135	0,11	Urgences Pédiatriques
RE65F88	65	<230	0,094	0,26	Urgences Pédiatriques

▪L'absence de détection d'un D.O. IgA pour certains échantillons avec des sérologies positives n'est pas très surprenante. Ces résultats ont été documentés dans « *Wang et Adler, J Clin Microbiol, 1996* » : l'utilisation d'écouvillons pour le prélèvement de la salive (étude ACMV) pourrait diminuer l'adsorption et le relargage des anticorps IgA.
Ce problème pourrait être affranchi par l'utilisation d'aspirateur en plastique
Pour le test IgA/Towne, (seuil de positivité : 0,3 = moyenne des négatifs plus 3 écart-types), les DO restent faibles, malgré la congélation des salives, qui augmente la sensibilité de l'ELISA IgA, probablement par altération des complexes immuns. .

Répartition des sérologies positives en fonction de l'exposition aux enfants avec le test Enzygnost Siemens cut –Off : <230U/mL (étude ACMV)

IgG sérique	Seropositive	Seronegative	Total
Exposés	11	12	23
non exposés	11	28	39



Chez les volontaires sains la prévalence des IgG dans le sérum et des IgA dans la salive est de 28,2% et 7,67% chez les 39 techniciens de laboratoire et de 47,8% et 21,7% chez les 23 membres du personnel des urgences pédiatriques du CHU de Limoges, ce qui est significatif. Dans le groupe exposé deux personnes séronégatives avaient des IgA salivaires détectables ce qui justifie de vérifier la spécificité du test.
Fait intéressant : les charges virales dans la salive étaeint indétectables par une technique de PCR maison dans le gène UL83.

Utilisation de la gB vaccinale et d'une IgA de souis humanisée comme standardpour optimiser la détection des IgA dans la salive avec une meilleure spécificité

Même méthode ELISA
Incororation d'une gamme de standard IgA : gamme lineéaire obtenue par dilution dans ldes salivesde volontaires CMV séronégatifs

Meilleure spécificité que la gB Towne recombinante (gb vaccinale purifiée et

Premiers essais sur des enfants : Taux faible d'igA dasn la salive prélevée su récouvillon en éponge et déchargée dasn un milieu Oragene. .

Conclusions

La séroprévalence et la réponse salivaire IgA anti CMV est significativement plus fréquente en pédiatrie qu'en laboratoire. Le test IgA salivaire peut être utile pour suivre la réponse immune locale. Afin d'améliorer sa spécificité les essais se poursuivent avec la gB recombinante vaccinale purifiée.