

ZV0001134

T.L.
F.V.R. OK

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (I.S.R.A.)

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
BP 2057

DAKAR-HANN

ZV0001134

RAPPORT DE STAGE
DU 1^{ER} AU 31 DECEMBRE 1993
A L'INSTITUT PASTEUR DE DAKAR

LA TECHNIQUE ELISA APPLIQUEE AU DIAGNOSTIC
DES ARBOVIROSES, NOTAMMENT LA FIEVRE DE LA
VALLEE DU RIFT

Par Modou Moustapha LO

Réf. N° 17 / PATHO. ANIM.

Juin 1994.

INTRODUCTION

Dans le cadre de ma participation à l'exécution du programme de la Fièvre de la Vallée du Rift au Sénégal, le Chef du programme a jugé utile que je suive un stage sur la technique ELISA appliquée au diagnostic de cette arbovirose à l'Institut Pasteur (CRORA).

La Fièvre de la Vallée du Rift est en effet une zoonose due à un arbovirus de la famille des Bunyaviridae genre Phlébovirus, responsable chez les ruminants d'hépatite nécrasante, d'avortement, de mortalité périnatale et causant chez l'homme une pathologie allant du syndrome grippal à des formes graves : syndrome ictéro-hémorragique, encéphalite et chorioretinite.

Le principe de la technique ELISA repose sur la formation d'un complexe antigène-anticorps révélable par une antiglobuline marquée à l'enzyme peroxydase.

Cet ensemble se traduit par une réaction colorée en présence d'un substrat spécifique.

1. MATERIELS

La réalisation de la technique ELISA nécessite comme matériels :

A. Matériels biologiques

- Immune ascite de souris F.V.R.
- Immune ascite de la chaîne "mu" (M) des immunoglobulines (Rabbit anti sheep IgM).
Catalogue n° 0214.0202 volume 5.0 ml
Maison distributeur CAPPEL
Adresse : Organon Teknika Corporation
1230 Wilson Drive
West Chester PA 19380
- Antigène spécifique (Ag F.V. R.)
- Antigène témoin (Ag de foie normal)
- Anti IgG spécifique (mouton ou bovin) marquée à la peroxydase (= Peroxydase conjugated) 3.214.0082 flacons de 2 ml
Catalogue n° 32 14.0082
Maison distributeur CAPPEL : même adresse que l'anti "mu"
- Les sérums à tester.

B. Matériels chimiques

- L'orthotoluidine (substrat)
Maison distributeur (Sigma n° T3501) : O.T.
- Dissoudre 5 mg d'O.T. dans 0,25 ml de N, N-Diméthyl formamide (Sigma n° D4254) puis ajouter 30 ml de tampon citrate/acide chlorhydrique pH 4 et 12 µl de H₂O₂ à 10 %. La solution obtenue doit être parfaitement incolore conservation à 4 °C et à l'obscurité (voir inactinique).

Répartir 100 μ l par cupule ce qui donne une coloration bleue (620 nm) après 10 mn, blocage avec 100 μ l d' H_2SO_4 coloration jaune (450 nm).

Le tampon pH4 : utiliser le tampon MERCK n° 9884/0001 Tp pH4, ou préparer le tampon suivant (conservation à +4 °C).

+ Acide citrique 1 H_2O (PROLABO n° 2027629 11,77 g

+ Hydroxyde de sodium (NaOH) PROLABO n° 2825229...4,4 g
(soude en pastille)

+ Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution. Ajouter encore 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec l'acide chlorhydrique IN ou 0,5 N goutte à goutte. Compléter à 1 litre avec l'eau bidistillée.

+ Péroxydase d'hydrogène : H_2O_2 à 30 % (MERCK ART 7210) à diluer au 1/3 exemporanément dans l'eau bidistillée (dilution de travail : H_2O_2 à 10 %).

- L'acide sulfurique H_2SO_4 2 N solution d'arrêt.

- Solution tampon de PBS pH 7,3 (phosphate Buffered saline) Tween 20 0,05 %, lait écrémé 1 %.

+ PBS.

. Dissoudre un comprimé dans 100 ml d'eau distillée stérile et autoclaver 10 mn à 11,5 C. Pour avoir la solution complète de Dulbecco, ajouter 0,5 ml de Dulbecco B (SR 39) à la solution autoclavée pH 7,3.

. Conserver dans un endroit frais et sec 10 à 15 °C à l'abri de la lumière.

Référence OXOID, code BR 14a boîte de 100 comprimés
tampon PBS Dulbecco 'A' usage in vitro

Maison distributeur : BIOLYON BP 13, 67572-DARDILLY Cédex x 2180 OXOID Limited, Basingstoke Hampshire England.

+ Tween 20 : Polyoxyéthylène Sorbitan monolaurate flacon de 500 ml
Distributeur : Maison SIGMA

+ Lait écrémé 1 % marque GLORIA en poudre

- Solution tampon citrate (acide citrique hydroxyde de sodium /eau distillée) pH 4.

C. Verreries et autres matériels

- Un spectrophotomètre couplé ou non à un ordinateur

- Des plaques polytyrènes ELISA de 96 cupules

- Un laveur de plaques (Microplate Washer 120)

- Tubes de 10 ml en verre

.../...

- Erlenmeyers de 50 à 200 ml
- Eprouvettes de 50, 100 et 250 ml
- Pipettes de 10 et 5 ml
- Micropipettes simples de 1 à 10 μ l, de 20 à 100 μ l, de 100 à 1 000 μ l
- Micropipette "Multicanaux" de 50 à 200 μ l
- Pipette Eppendorf distributeur avec un embout Eppendorf sous forme de seringue
- Tube Eppendorf de 2 ml pour les sérums à diluer
- Propipette ou poire de 5 et 10 ml
- Kleenex en rouleau (format moyen et grand format)
- Papier absorbant.

II. METHODES OPERATOIRES

2.1 - Détection des IgG (immunoelobuline G)

- Sensibilisation des plaques :

Avant la sensibilisation proprement dite, on divise transversalement la plaque de 96 cupule en 6 rangées de 8 cupules à l'aide d'un marqueur indélébile.

Avec un anticorps de souris anti-virus à tester (immuno-ascite de souris) en milieu tampon carbonate pH 9 dilution : (en général 1 / 1000).

Pour une plaque : prévoir 10 ml de solution. Bien homogénéiser avant la répartition (100 μ l par puits). Couvrir et placer une nuit à 4 C.

- Lavage des plaques avec un tampon PBS + Tween 20 à 0,05 % ; en série de 3 lavages (compter 30 ml /lavage/plaque)

Secouer sur papier absorbant les plaques pour éliminer toute trace de liquide de lavage.

- Préparer les solutions d'antigènes à la dilution préconisée par titrages antérieurs. **Diluant** PBS Tween 20 à 0,5 %, lait écrémé 1 %

Pour une plaque, il faut 5 ml d'antigène à tester et 5 ml d'antigène témoin. Bien homogénéiser. Répartir les antigènes par colonnes alternées antigène test-antigène témoin. Couvrir, incuber une heure à 37 C.

L'antigène est une suspension inactivée à β propiolactone de cerveaux de foie de souris nouveaux-nés infectés avec le virus.

L'antigène témoin est constitué par une suspension similaire de cerveaux ou foie de souriceaux nouveau-nés mais non infectés.

Les antigènes sont conservés à -70°C jusqu'à utilisation. L'antigène témoin permet la détection de réaction non spécifique de certains sérums dont des anticorps "naturels" anti-souris.

Préparer les dilutions des sérums à tester au 1/100^e : répartir 10 μl de sérum au fond de cupules des boîtes de dilution et ajouter ensuite 1 ml de tampon PBS Tween 20 0,05 % lait écrémé 1 % de dilution. Les cupules sont arrangées de telle sorte qu'elles correspondent au plan des plaques. Ajouter systématiquement des sérums de contrôle négatif et positif.

- Lavage des plaques (3 fois)
- Addition des sérums dilués en double (une cupule test + une cupule témoin) 100 μl /cupule. Couvrir. Incuber une heure à 37°C .
- Préparer la solution de conjugué anti-espèce (des sérums à tester) à la dilution déterminée par titrage précédent. Soit 10 millilitres par plaque. Bien homogénéiser.
- Lavage des plaques (3 fois)
- Addition du conjugué dilué: 100 μl par cupule. Couvrir. Incuber une heure à 37°C
- Préparer le substrat chromogène : orthotolidine (SIGMA). Compter 10 ml par plaque
- lavage des plaques 3 fois. Séchage.
- Répartition du substrat chromogène 100 μl /cupule. Homogénéiser les plaques. Placer à l'obscurité jusqu'à apparition d'une coloration bleue (cupule témoin positif) soit environ 5 minutes.
- Bloquer la réaction avec une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) 2N 100 μl par cupule. Homogénéiser doucement. Vérifier l'absence des bulles pouvant fausser la lecture.
- les différences de densité optique (DO) entre les cupules test et témoin sont mesurées à 450 nanomètres à l'aide d'un photomètre Titer Tek Multiscan MCC /340, Flow laboratoires, IRVINE, Scotland) couplé à un ordinateur PC avec programme LOTUS 123. L'histogramme de distribution des D.O. et la moyenne de la population des négatives sont déterminés. Les sérums sont considérés positifs quand la différence de densité optique (DO) est supérieure à la moyenne des négatives \pm écart-types.

2.2 - Détection des IgG

- Sensibilisation des plaques avec un anticorps anti μ espèce à tester F(ab')₂. Couvrir et placer une nuit à $t-4$.
- lavage en PBS Tween (3 fois). Séchage.
- Diluer les sérums au 1/100^e (voir pour les IgG). Ajouter 100 μl de sérum dilué par cupule test et témoin. Sauf les témoins sérums positif et négatif.
- Couvrir et incuber une heure à 37°C .

- Préparer les dilutions d'antigènes test et témoin (voir comme pour les IgG).
- Lavage en PBS Tween 20 3 fois. Séchage.
- Préparer la solution d'anticorps de souris spécifique de l'antigène à tester (immune ascite) à la dilution préalablement déterminée (10 ml par plaque). Répartir 100 µl par cupule. Couvrir et incuber une heure à 37 C.
- Lavage en PBS Tween (3 fois). Séchage.
- Préparer la solution de conjugué peroxydase anti-souris. Répartir 100 µl par cupule. Couvrir et incuber une heure à 37 C.
- Lavage en PBS Tween (3 fois). Séchage.
- Préparer le substrat chromogène. Répartir 100 µl par cupule. Placer à l'obscurité jusqu'à apparition d'une coloration bleue (cupule témoin positif) soit environ 5 mn.
- Bloquer la réaction avec une solution d'acide sulfurique H₂SO₄ 2N 100 µl par cupule. Homogénéiser doucement. Lire à 450 nanomètres.

TECHNIQUE DE TITRAGE DE REACTIES

1. Titraee d'un conjugué

- Sensibiliser la plaque avec l'immune ascite de souris et incuber à +4° pendant une nuit.
- Lavage au PBS Tween (3 fois).
- Distribuer antigènes test et témoin (comme pour les IgG et IgM), incuber à 37°C pendant une heure.
- Lavage au PBS Tween (3 fois).
- Diluer un sérum connu positif et négatif, distribuer et incuber à 37° C pendant une heure.
- Lavage au PRS Tween (3 fois).
- Diluer le conjuué à titrer, la dilution peut varier du 1 /500ème au 1 /50.000ème, cela dépend de la maison fabricant, distribuer à raison de 100 µl par cupule, incuber 1 heure à 37° C.
- Lavage au PBS Tween.
- Mettre le substrat.
- Stopper la réaction au bout de 5 à 10 minutes avec l'acide sulfurique.
- Lire au spectrophotomètre couplé à l'ordinateur. A 1 a dilution la plus faible où la différence de densité optique (DO) s'approche de 0,09 qu'on considère le titre.

.../...

2. Titration d'un antigène

- Sensibiliser la plaque avec l'immune-ascite de souris, incuber à +4° C pendant une nuit.
- Lavage au PBS Tween 20 (3 fois).
- Diluer l'antigène à titrer du 1/10ème, de même que l'antigène témoin. Distribuer et incuber à 37 C pendant une heure.
- Lavage au PBS Tween 20 (3 fois)
- Diluer le sérum positif connu et le sérum témoin négatif connu, distribuer, incuber 1 heure à 37° c.
- Lavage au PBS Tween 20 (3 fois).
- Mettre le conjugué, incuber une heure à 37° C.
- Lavage au PBS Tween (3 fois).
- Mettre le substrat.
- Arrêter avec l'acide sulfurique 2N.
- Lire au spectrophotomètre. A la plus faible dilution où la différence de densité optique s'approche de 0,05 (seuil de positivité) qu'on a le titre.

3. Titration d'un sérum

- Sensibiliser la plaque avec immun-ascite de souris et incuber à +4° C pendant une nuit.
- Lavage au PBS Tween 20 (3 fois).
- Diluer les antigènes test et témoin, distribuer et incuber à 37°C pendant une heure.
- Lavage au PBS Tween 20 (3 fois).
- Diluer le sérum à titrer du 1.200ème au 1/25.000ème, puis distribuer et incuber à 37° C pendant une heure.
- Lavage au PBS Tween 20.
- Mettre le conjugué et incuber à 37° pendant une heure.
- Lavage au PBS Tween 20.
- Distribuer le substrat et au bout de 5 à 10 mn, arrêter la réaction avec l'acide sulfurique.
- Lire au spectrophotomètre.

Interprétation : à la plus faible dilution où la différence de densité optique (DO) s'approche de 0.09 (seuil de positivité correspond le titre du sérum.

4, Technique de préparation d'un antiène

a) Matériel

- Souriceaux nouveau-nés d'un jour ou 2 à 3 jours (pour un virus inconnu).
- Souris de 2 mois pour la Fièvre de la Vallée du Rift (pour avoir un bon titre).
- Seringue à insuline.
- Seringue à 10 cc avec une grosse aiguille de 18 G.
- Mortier broyeur avec son omnimixer.
- Pot à centrifuger.

b) Réactifs

* Tampon orate pH **9.0**

. NaCl 1,5 M 80 ml

PM : 58,54

NaCl 1,5 M \Leftrightarrow 58,54 x 1,5 \Leftrightarrow 87,81 g/litre d'eau

. Acide borique 0,5 M \rightarrow 100 ml

H_3BO_3 PM 61,81 g

Acide borique 0,5 M \Leftrightarrow 61,81 x 0,5 \rightarrow 30,9 g/litre

. Soude NaOH

PM : 40 g

NaOH 1 N \Leftrightarrow 40 g/litre d'eau

. H₂O distillée qsq \rightarrow 1 000 ml

NB : Pour avoir l'acide borique H_3BO_3 0,5 M, il faudra 30,9 g + 700 ml d'eau distillée chaude + 1 000 ml d'eau distillée.

- Tampon Tris pH 8,5 21 °C

. Tris base \rightarrow 121,1 g

. H₂O distillée \rightarrow 800 ml

PM : 18 g

. 2 M HCl pour ajuster le pH à 8,5 à la température de 21 °C.

PM 23 + 35,5 à 58,5 g HCl 2 N \Leftrightarrow 117 g/litre d'eau

H₂O distillée \rightarrow 1 000 ml.

- β Propiolactone (BPPL) à -20 °C.

c) Manipulation

Remarque : Pour les souriceaux, l'inoculation se fait en intra-cérébral (IC) et les souris adultes en intra-péritonéales (IP).

- Récolter les souriceaux nouveau-nés infectés quand il y a 10 % de mortalité.

.../...

- Congeler-les à -70°C en emballage bien étiqueté pendant une nuit.
- Décongeler et conserver à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant quelques heures.
- Désinfecter à l'alcool à 70°C .
- Faire sécher et aspirer les cerveaux à la seringue munie d'une aiguille 18 G.
Ajouter le tampon borate pH 9 (0,9 ml de tampon borate pour un cerveau récolté).
- Homogénéiser à l'omnimixer.
- Ajouter le tampon Tris 1/10 du volume total (volume de tampon borate + volume de cerveau).

NB : Le volume de chaque cerveau équivaut à 0,1 ml.

- Ajouter le β PPL environ 2 gouttes, bien mélanger et placer 72 heures à $+4^{\circ}\text{C}$ dans des pots à centrifuger.
- Centrifuger à 10.000 tours/m, pendant 20 mn.
- récupérer le surnageant et alicoter dans des tubes Eppendorf à raison de 1 à 2 ml (garder au congélateur).
- Titrer l'antigène.

CONCLUSION

La surveillance sérologique de la Fièvre de la Vallée du Rift, avec la méthode ELISA, peut se faire sur des animaux non individuellement identifiés dans des sites sentinelles choisis et fixes dans l'intervalle de temps défini pour la surveillance.

La circulation du virus se traduit par l'observation de titre élevés de forte prévalence en IgM au niveau du groupe d'animaux prélevés. La non-activité virale se traduit par la mise en évidence sur les sites sentinelles de prévalence en IgG comparable en diminuant avec le temps.

Cette méthode sérologique utilisée permet d'obtenir les résultats 48 heures après le retour au Laboratoire, ce qui laisse toute liberté de r intervention sur le terrain si cela est nécessaire, pour tenter l'isolement du virus dans un foyer suspect d'infection en cours.