

ZV0501164

06.

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

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

FICHE TECHNIQUE

L'HEMAGGLUTINATION ET L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION
DU VIRUS PARA-INFLUENZA TYPE 3

Par P.C. LEFEVRE

Service de Virologie - LNERV

REF. N° 95/VIRO.
SEPTEMBRE 1982.

INTRODUCTION

Le virus para-influenza type 3 est un virus relativement récent en médecine vétérinaire : il n'a été isolé la première fois qu'en 1959 d'une maladie respiratoire de bovins. Par la suite, de nombreuses études (isolement ou enquêtes sérologiques) ont montré qu'il était fréquemment impliqué dans des troubles pulmonaires de nombreuses espèces domestiques. En Afrique sahélierienne, son rôle dans les "pneumopathies des petits ruminants" a été soupçonné depuis plusieurs années.

En dehors d'isolements systématiques lors de foyers, seule une enquête basée sur la réaction d'inhibition de l'hémagglutination permet d'évaluer la prévalence de l'infection et par conséquent son impact économique.

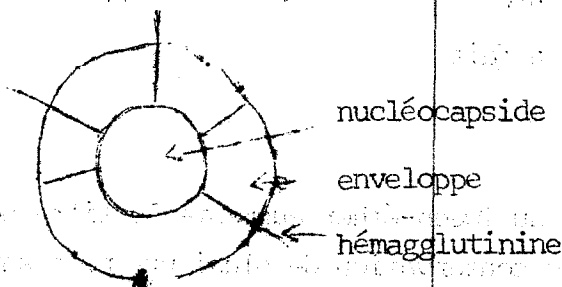
Le virus para-influenza type 3 possède une hémagglutinine vis-à-vis des hématies de cobayes et de mutons. Toutefois cette HA est souvent noyée dans l'enveloppe lipoprotéique et un traitement des virus est nécessaire pour augmenter le titre.

Les réactions d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination ont été décrites et codifiées par plusieurs auteurs.

Cette note a pour but de proposer une technique simple, rapide afin que les résultats obtenus d'une année sur l'autre ou dans d'autres pays d'Afrique soient comparables.

1 - TRAITEMENT DU VIRUS PARA-INFLUENZA TYPE 3 POUR LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

But : Le virus para-influenza type 3 a la propriété d'hémagglutiner les hématies de certaines espèces animales : cobaye, mouton. Cette propriété est portée par l'hémagglutinine qui apparaît comme des projections perpendiculaires à la nucléocapside, projections souvent noyées dans l'enveloppe lipoprotéique (voir schéma).



Le but du traitement est d'augmenter le titre hémagglutinant en décapant l'enveloppe du virus.

Technique

- Culture du virus (souche SF4 ou IM) sur cellules de rein de mouton jusqu'à ECP complet (15 jours)
- Trois cycles de congélation - décongélation
- Ajouter 0,125 ml de Tween 80 pour 100 ml de suspension virale. Laisser 15' à température ambiante
- Ajouter de l'éther à volume égal à celui de la suspension virale. Laisser 1 h à 4° en agitant de temps en temps
- Centrifuger à 1 500 tpm pendant 10'
- Récupérer l'antigène sans détruire la couche de Tween 80 qui se forme à la surface
- Evaporer l'éther sous vide pendant 1 heure.

Résultats

Une comparaison entre antigène traité et antigène non traité a été effectuée et les résultats colligés dans le tableau suivant :

	Titre départ (1)	1 mois	2 mois	3 mois	Conservation
T. TE	256 (2)	2 5 6	256	256	Congélateur
NT	32	16	NF	NF	
T. TE	256	256	NF	128	Réfrigérateur
NT	3 2	NF	NF	NF	

(1) moyenne de 5 titrages au moins

(2) inverse de la dilution donnant une HA totale

NF non fait

Conclusions

Le traitement au Tween-éther augmente le titre de l'antigène de 3 à 4 dilutions et permet une conservation de plusieurs mois sans baisse importante du titre.

II - REACTIONS D'HEMAGGLUTINATION ET D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION
DU VIRUS PARA-IM'LUENZATYPE 3

INTRODUCTION

Les 2 réactions peuvent se faire soit en tubes, soit en microplaques (microtiter - Dynatech corporation).

A- REACTIONS

1 - En tubes

Réaction d'hémagglutination

tubes	1	2	3	11	12
PBS	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4
Virus	0,2	0,4	0,4	0,4	
GR 0,8 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Dilution	1/4	1/8	1/16	1/5096	TGR

Réactions d'inhibition de l'hémagglutination

tubes	1	2	3	9	10	11	12
PBS	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2
sérums 1/10 (voir plus loin)	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
dilution sérums	1/10	1/20	1/40	1/2560	TS	TGR	TV
virus (4 u HA)	0,2	0,2	0,2	0,2			0,2
			1h à 37°				
GR 0,8 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

.../...

2 - En microplaques

Réaction d'hémagglutination

Matériel = plaques à fonds ronds

Micro-dilution de 0,05 ml

Micro-pipette de 0,05 ml (1 gg)

cupules	1	2	3.....11	
PBS		0,05	0,05.....0,05	0,1
		0,05	0,05	0,05
Virus	0,1			
GR 0,8 %	0,05	0,05	0,05..... 0,05	0,05

Réaction d'inhibition de l'hémagglutination

cupules	1	2	3..... 9	10	11	12
PBS		0,025	0,025 0,025	0,025	0,05	0,025
		0,025	0,025			
Sérum 1/10	0,05 (1 gg)			0,025	--	-
Virus (4 u HA 0,025)	0,025	0,025	0,025.....0,025	-	-	-
Dilution sérum	1/10	1/20	1/40 1/2560	} TS TGR TV		
			1h 30 à température ambiante			
GR 0,8 %	0,05	0,05	0,05 0,05	0,05	0,05	0,05

Matériel' = plaques à fonds ronds

micro-diluteur de 0,025 ml

micro-pipettes de 0,05 ml

pipettes de Duclaux = 1 gg = 0,05 ml.

COMMENTAIRES

- 1. - La réaction en microplaque permet le traitement d'un grand nombre de sérums avec 1 minimum de travail
 - la distribution du sérum traité peut se faire à la pipette Duclaux (1 gg = 0,05 ml)
 - le micro-diluteur de 0,025 ml n'a pas besoin d'être flambé et humidifié après chaque sérum. Il suffit de plonger le micro-diluteur dans l'eau distillée et vérifier le volume à l'aide d'un buvard GO - NOGO
 - les microplaques à fonds ronds permettent une meilleure appréciation des résultats intermédiaires (2 t 3 + ou 4 t) que les plaques à fonds coniques.
- 2 - Des expériences (LEFEVRE - Rapport Farcha 19 -1380) ont montré :
 - que le PBS pH 7,2 est aussi bon diluant que le VAD (virus adjusting diluant)
 - que le pH doit être compris entre 6,8 et 7,4
 - que la lecture est plus rapide à 37°
 - que la concentration optimum des GR est de 7 p.100.

B - TRAITEMENT DES SERUMS

Pour la réaction d'HA, il est recommandé de traiter les sérums pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques (traitement au kaolin) où les hémagglutinines non spécifiques (traitement aux GR).

BERNARD s'appuyant sur les résultats de PROVOST et BORREDON estime que le traitement au kaolin est inutile, les inhibiteurs non spécifiques disparaissent au 1/40è.

Les expériences du service de Virologie portent sur un petit nombre de sérums tout venant : 16 sérums de moutons et chèvres prélevés à Doli.

1 - Résultats

1) Traitement au kaolin

	Nombre de positifs au				
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
Sérums traités au kaolin	12	4	2	1	1
Sérums non traités	16	16	3	1	1

La discordance est nette au 1/20^è où semble que les inhibiteurs non spécifiques aient disparu après traitement. Au 1/40^è, 6 sérums non traités sont positifs contre 2 seulement après traitement.

Le traitement au kaolin est donc nécessaire.

2) Traitement aux GR

	Négatifs	+ 1/40 ^è	+ 1/40 ^è et plus
traités (K + GR)	6	5	5
non traités	4	7	5

Il apparaît qu'en revanche, les hémagglutinines non spécifiques n'interviennent pas.

2 - Traitement des sérums

a) au kaolin = suspension de kaolin lavé aux acides à 25 g pour 100 ml d'eau distillée

PBS = 0,4 ml

Sérum = 0,1 ml.

Kaolin = 0,5 ml

20' à température ordinaire avec agitation périodique centrifugation 1 500 tpm pendant 15 mn. Le surnageant est considéré être la dilution au 1/10 du sérum.

b) Si nécessaire (pour les petits ruminants, ce traitement est inutile)

Suspension de GR de cobayes à 50 p.100

Ajouter 0,1 ml au surnageant du traitement au kaolin. Laisser 1 h. à 4°C avec agitation périodique. Centrifuger.

CONCLUSIONS

Pour standardiser la technique au niveau du laboratoire et pour une comparaison possible des résultats, il est proposé de faire les réactions HA et IHA :

- en microplaques (plaques à fonds ronds)
- avec du PBS pH 7 ou 7,2
- avec un antigène traité au Tween-éther
- après traitement des sérums au kaolin.
- et prise en considération des résultats au 1/1¹ - 2 + -

NOTA

Une remarque in-portante doit être faite :

Il n'y a pas corrélation entre le titre en anticorps inhibant l'hémagglutination et en anticorps neutralisant.

Par conséquent, la présence d'anticorps IHA ne traduit qu'un contact précédent avec le virus para 3 sans préjuger de l'état d'immunité des animaux.

B I B L I O G R A P H I E

JOHN (T.J.) , FULGINITI (V.A.) - Para-influenza 2 virus : Increase in hemagglutinin titer on treatment with Tween 80 and Ether.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1966, 121 : 109-111.

BERNARD (G.) - Etude de l'immunité naturelle ou acquise du troupeau sénégalais vis-à-vis de la peste bovine et des maladies apparentées. Thèse Doctorat Université de Dakar.

PROVOST (A.) , BORREDON (C.) -- Rapport annuel du Laboratoire de Farcha, 1965 : p. 60 et 61.