

ZV 000 12/14

INSTITUT D'ÉLEVAGE ET DE MÉDECINE
VÉTÉRINAIRE DES PAYS TROPICAUX

REVUE D'ÉLEVAGE
ET DE
MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
DES PAYS TROPICAUX

**Adaptation en microtest de la technique
de séroneutralisation par la méthode
cinétique pour la recherche et le titrage
des anticorps neutralisant le virus
de la peste bovine**

par M. RIOCHE

Tome XXII (nouvelle série)

N° 4 — 1969

==== VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS ====
23, rue de l'École-de-Médecine, PARIS-VI^e

Adaptation en microtest de la technique de séroneutralisation par la méthode cinétique pour la recherche et le titrage des anticorps neutralisant le virus de la peste bovine

par M. RIOCHE

RÉSUMÉ

L'auteur décrit une adaptation en microtest de la technique de séroneutralisation du virus de la peste bovine par la méthode cinétique mise au point par BOURDIN et BERNARD (1967). L'analyse statistique des résultats obtenus sur 453 sérums de ruminants testés qualitativement à la fois par la méthode classique et par le microtest ne permet pas de mettre en évidence une différence entre les deux méthodes qui sont donc superposables et peuvent être utilisées indifféremment dans la recherche qualitative des anticorps. La microméthode a l'avantage d'économiser temps et réactifs. L'étude statistique des résultats obtenus dans le titrage des anticorps de 116 sérums montre une différence très significative entre les deux méthodes mais aussi qu'il existe une liaison très forte entre elles. Lorsque le titrage des anticorps porte sur de grands effectifs, le microtest peut aussi être utilisé car les avantages qu'il présente compensent son manque éventuel de sensibilité par rapport à la méthode classique.

Les techniques immunologiques tendent actuellement à la miniaturisation en raison des avantages que les microméthodes offrent en sérologie : rapidité, faible encombrement, économie de réactifs et facilité de lecture. Connues depuis plusieurs années, (BARSKY et LEPINE, 1954) (TAKATSY, 1955), ces techniques sont actuellement utilisées en pratique courante dans diverses réactions sérologiques telles que l'hémagglutination et l'inhibition de l'hémagglutination (SEVER, 1962), la fixation du complément (SEVER, 1962) (CASEY, 1965) ou la réaction de neutralisation (SALIM, 1967).

L'adaptation en microtest de la méthode cinétique de séro-neutralisation décrite en 1967

par BOURDIN et BERNARD pour la recherche des anticorps neutralisant le virus de la peste bovine, se justifie par le grand nombre d'examen sérologiques actuellement effectués chez les ruminants de l'Afrique de l'Ouest pour l'appréciation des résultats des campagnes de vaccination contre la peste bovine et aussi pour les recherches épidémiologiques chez les petits ruminants.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

1) Matériel.

Nous n'indiquerons ici que le matériel destiné spécialement à la réalisation du microtest :

a) Plaques en matière plastique transparente de 124×81 mm contenant 96 cupules de 0,4 ml à fond plat (Limbro Chemical réf. 15 Fb 96). Ces plaques sont préalablement lavées, cupule par cupule dans une solution d'OMO (produit à base de Teepol) puis rincées 10 fois à l'eau courante, 3 fois à l'eau désionisée, 3 fois à l'eau tridistillée. Après séchage à l'étuve, elles sont stérilisées dans l'alcool à 95° pendant 30 mn puis séchées dans une hotte à rayons ultraviolets pendant 3 à 4 heures. Elles sont conservées en boîte de Pétri stériles fermées hermétiquement, si leur utilisation est différée.

b) Pipettes compte-gouttes en verre à chimie : ces pipettes, préparées en laboratoire, forment des gouttes de $0,015 \text{ ml} \pm 5 \text{ p. } 100$. Il est possible aussi d'utiliser des aiguilles de 6/10 montées sur tige de verre (1 goutte = 0,015 ml).

2) Méthode.

La microtechnique décrite ici n'est qu'une adaptation de la méthode classique mise au point par BOURDIN et BERNARD en 1967 (*). Les substances entrant en réaction sont les mêmes, la réalisation identique. Seules les quantités de réactifs changent mais leurs proportions relatives restent les mêmes afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par les deux méthodes.

Ainsi dans la méthode classique, les auteurs mettent en contact 0,05 ml de sérum à étudier décomplémenté avec 0,5 ml d'une suspension de virus bovinepistique représentant I DICT 100. Après 1 heure d'étuve à 37 °C, ils ajoutent 0,5 ml d'une suspension cellulaire titrant 100.000 cellules/ml de la lignée cellulaire permanente MDBKC (cellules épithéliales de rein de bovin adulte) établie en 1958 par MADIN et DARBY. Le microtest, lui, requiert les quantités suivantes : 0,015 ml de sérum décomplémenté à étudier (1 microgoutte), 0,15 ml de virus titrant I DICT 100 dans 0,5 ml. La dilution finale de sérum est donc 10^{-1} comme dans la méthode classique et la quantité de cellules introduites après la neutralisation est proportionnellement équivalente : 0,15 ml d'une suspension comptant 100.000 cellules/ml.

(*) Cette méthode a aussi été adaptée au titrage des anticorps (RIOCHE 1969).

a) Réalisation de la technique qualitative : de même que dans la technique classique 3 tubes sont utilisés pour chaque sérum, nous utilisons, par sérum, 3 cupules qui reçoivent :

1^{re} cupule : TÉMOIN SÉRUM :

0,15 ml de milieu de culture,
+ 0,015 ml de sérum,
1 heure à 37 °C,
+ 0,15 ml de suspension cellulaire.

2 et 3^{es} cupules : RÉACTION :

0,015 ml de sérum,
+ 0,15 ml de suspension de virus
1 heure à 37 °C,
+ 0,15 ml de suspension cellulaire.

Ensuite les plaques sont recouvertes d'un plastique adhésif et remises à 37 °C pendant 5 jours.

b) Réalisation de la technique quantitative : elle est identique à la précédente à la différence que l'on utilise pour chaque sérum à tester :

— 2 cupules « témoin sérum »

— 2 cupules « réaction » recevant une microgoutte de sérum non dilué, 2 autres cupules recevant 1 microgoutte de sérum dilué au 1/2, ainsi de suite jusqu'aux dilutions terminales de 1/320 pour les sérums de bovins (1 microgoutte de sérum dilué au 1/32) et 1/80 pour les sérums de petits ruminants (1 microgoutte de sérum dilué au 1/8).

A partir de la dilution au 1/20, le sérum entrant en réaction est considéré comme insuffisant pour la nutrition des cellules et la suspension cellulaire est alors additionnée de 4 p. 100 de sérum normal de bœuf décomplémenté.

Le titre neutralisant du sérum est donné par la plus haute dilution dans laquelle le tapis cellulaire est soit indemne, soit partiellement détruit par le virus dans les deux cupules. Si cette dilution est I/N nous admettons que le sérum considéré titre « N » unités neutralisantes I DICT 100 de virus bovinepistique/ml.

Quelle que soit la méthode utilisée, nous ajoutons 5 « témoins cellules » et 5 « témoins virus ». Les cupules « témoins cellules » reçoivent 0,015 ml de sérum décomplémenté (de bœuf, de mouton ou de chèvre selon l'espèce animale faisant l'objet de la séro-neutralisation) et 0,15 ml de milieu de culture. Après une heure

TABLEAU N° I

Espèce et provenance des sérums	Résultats positifs		Résultats négatifs	
	Microtest	Méthode classique	Microtest	Méthode classique
Bovins. Région de Saint-Louis	129	126	17	20
Bovins. Sierra-Leone	40	43	13	10
Bovins. Région de Kedougou	44	44	19	19
Petits ruminants. Casamance	51	47	43	47
Petits ruminants. Dahomey	40	39	57	58
Total	304	299	149	154

à 37 °C, on ajoute 0,15 ml de suspension cellulaire. Après 5 jours à 37 °C, les tapis cellulaires doivent présenter un aspect normal et être indemnes de lésions.

Les cupules «témoins virus» reçoivent 0,015 ml de sérum décomplémenté dépourvu d'anticorps, 0,15 ml de suspension de virus (1 DICT 100 dans 0,5 ml) puis après une heure à 37 °C, 0,15 ml de suspension cellulaire. Après 5 jours à 37 °C les tapis cellulaires doivent être totalement détruits par le virus.

II. — RÉSULTATS OBTENUS

Afin de savoir si la microméthode donne des résultats comparables à ceux de la méthode classique en tubes à hémolyse, tous les essais ont été effectués par les 2 méthodes. Pour réaliser des conditions expérimentales identiques, lors de chaque essai, la même suspension de virus et la même suspension de cellules ont servi à la réalisation des deux méthodes. Les réponses sérologiques fournies par les deux méthodes sont les suivantes :

a) Technique qualitative :

Cette technique utilisant deux tests par échantillon de sérum, trois résultats différents peuvent être observés :

1) Les deux tapis cellulaires sont indemnes (le sérum a neutralisé le virus) : résultat positif.

2) Un tapis sur deux est indemne : résultat douteux.

3) Les deux tapis cellulaires sont détruits par le virus (le sérum ne contient pas d'anticorps) : résultat négatif.

Les ruminants dont le sérum dilué au 1/10 donne un résultat douteux étant considérés comme non immuns, nous considérerons ces résultats comme négatifs.

Dans ces conditions les séro-neutralisations effectuées sur 191 sérums de petits ruminants et 262 sérums de bovins par les deux techniques qualitatives donnent les résultats figurant dans le tableau I.

b) Technique quantitative :

116 sérums de bovins ont été testés. Les titres obtenus par chacune des deux méthodes sont consignés dans le tableau II et représentés graphiquement dans les histogrammes I et II.

TABLEAU N°II

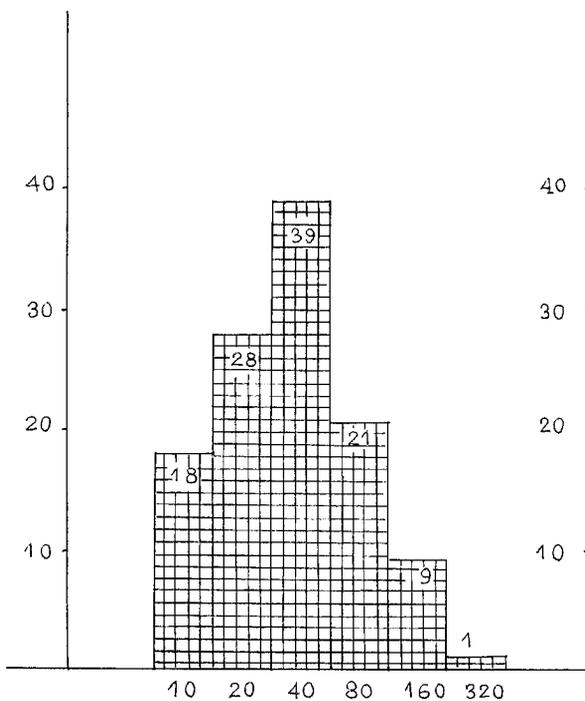
Titre des sérums en unités neutralisantes	Nombre de sérums ayant ce titre	
	par le microtest	par la méthode classique
10	18	13
20	28	25
40	39	34
80	21	23
160	9	20
320	1	1
Total	116	116

III. — ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS

La comparaison des deux méthodes en technique qualitative faisant intervenir un caractère qualitatif, c'est par le test du χ^2 de PEARSON que les résultats pourront être analysés.

Histogramme I

Distribution des sérums en fonction de leur titre déterminé par le microtest

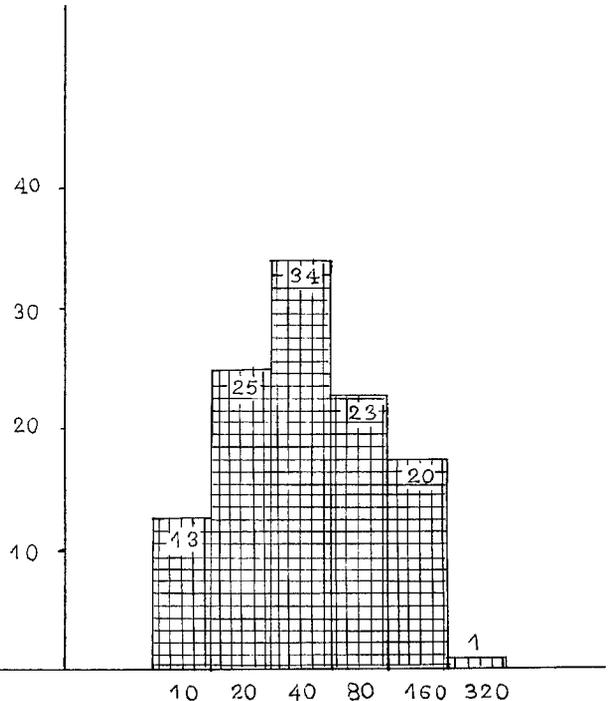


En abscisses : titre des sérums

En ordonnées : nombre de sérums donnant ces titres

Histogramme II

Distribution des sérums en fonction de leur titre déterminé par la méthode classique



Au contraire les techniques de titrages portent sur un caractère quantitatif et c'est le test de l'écart réduit qui permettra de comparer les deux méthodes.

a) Analyse des résultats obtenus par les techniques qualitatives (*):

Le test du χ^2 comparant des répartitions observées à des répartitions théoriques, celles-ci peuvent être calculées à partir des résultats consignés dans le tableau n° 1 et l'on calcule les effectifs théoriques suivants :

— Positifs (+) « c » = 301,5

— Négatifs (—) « c » = 151,5

et + « μ » = 301,5

— « μ » = 151,5

On obtient alors une valeur de $\chi^2 = 0,124$ pour un degré de liberté, correspondant à un risque α compris entre 0,90 et 0,50. Cette valeur est très inférieure à 3,841 qui correspond au χ^2 pour un risque $\alpha = 0,05$. Il n'existe donc pas de différence significative entre les résultats obtenus par l'une et l'autre méthode.

b) Analyse des résultats obtenus par les méthodes quantitatives :

Chaque sérum ayant été examiné par les deux méthodes, le procédé le plus correct pour

(*) Dans la suite de l'exposé toutes les valeurs portant l'indice « μ » concernent la microméthode alors que l'indice « c » concerne les valeurs calculées pour la méthode classique.

effectuer la comparaison est la méthode des séries appariées. L'écart réduit est :

$$\epsilon = \frac{m}{s\sqrt{n}} \text{ où } m \text{ est la moyenne des différences}$$

des titres pour chaque couple de mesure. Pour 116 sérums nous obtenons alors :

$$m = 11,29 \text{ et } S^2 = 1562,6 \text{ d'où } \epsilon = 3,077$$

Cette valeur est nettement supérieure à la valeur 1,96 qui correspond à un risque de 0,05. Elle correspond à une valeur de α comprise entre 0,01 et 0,001. Ce résultat permet de conclure que les différences constatées dans le titrage des anticorps par les deux méthodes sont significatives.

Puisque le titre neutralisant d'un sérum varie en fonction de la méthode utilisée, il est utile de compléter l'étude statistique des résultats observés en cherchant si les deux méthodes de titrage sont cependant liées.

La recherche de l'existence d'une liaison se fait par le calcul du coefficient de corrélation, qui peut s'effectuer à partir du tableau III dans lequel nous avons procédé à un changement d'unité. C'est ainsi que la valeur x du titre est remplacée par $x' = \log_2 \frac{x}{10}$. Aux valeurs de $x' = 0, 1, 2, 3, 4$ et 5 correspondent les valeurs d'origine $x = 10, 20, 40, \dots, 320$.

TABLEAU N°III

	0	1	2	3	4	5
0	6	4	3	-	-	-
1	5	11	9	-	-	-
2	3	10	16	3	-	-
3	2	3	6	11	1	-
4	-	-	3	7	9	1
5	-	-	-	-	1	-

Les calculs permettent d'obtenir un coefficient de corrélation :

$$r = 0,7$$

et une valeur $t = 10,4$ pour 114 d. d. l.

Cette valeur élevée de t indique que les deux techniques de titrage sont très fortement liées, le risque correspondant étant de loin inférieur à 0,05.

IV. — CONCLUSIONS

L'analyse statistique des résultats observés ne nous a pas permis de mettre en évidence une différence entre les deux techniques de séro-neutralisation cinétique qualitative. Ces deux méthodes sont donc comparables et il semble qu'elles puissent être utilisées indifféremment pour la détection des anticorps neutralisant le virus de la Peste Bovine chez les ruminants. La microméthode présente l'avantage de sa rapidité d'exécution et de sa facilité de lecture.

Au contraire et bien que les deux techniques soient significativement liées, microméthode et méthode classique ne donnent pas des réponses identiques pour le titrage des anticorps puisque l'analyse statistique des résultats révèle une différence très significative. Le titre moyen en anticorps (49,4) obtenu par le microtest est inférieur au titre moyen (63,3) observé dans la méthode classique. La microtechnique fournit donc des titres en général moins élevés que la méthode classique. Ce manque de sensibilité des microméthodes est d'ailleurs reconnue à l'heure actuelle.

En conséquence, nous estimons que dans la pratique, le microtest peut remplacer avantageusement la méthode classique pour la détection des anticorps neutralisant le virus de la Peste Bovine.

Il en sera de même pour le titrage des anticorps lorsque les recherches porteront sur de grands nombres (appréciation de l'état d'immunité naturelle ou acquise d'un grand effectif par exemple), l'économie de temps et de réactifs que permet de réaliser la microméthode compensant alors largement le manque de sensibilité qu'elle présente peut-être par rapport à la méthode classique.

Remerciements.

Nous adressons nos vifs remerciements au Docteur BARME, Chef de Service à l'Institut Pasteur de Dakar qui a bien voulu nous aider de ses conseils dans l'analyse statistique de nos résultats.

*Institut d'Élevage et de Médecine
vétérinaire des Pays tropicaux
Maisons-Alfort*

*Laboratoire national de l'Élevage
et de Recherches vétérinaires
Dakar-Hann*

SUMMARY

Adaptation in microtest of the seroneutralization technique by the kinetic method for the research and the titration of antibodies neutralizing the rinderpest virus

The author describes an adaptation in microtest of the seroneutralization technique of the rinderpest virus by the kinetic method perfected by BOURDIN and BERNARD (1967). The statistical analysis of results obtained on 453 serums of ruminants qualitatively tested at the same time by the classical method and by the microtest may not display a difference between the two methods. Then, they are superposable and may be employed indifferently in the qualitative research of antibodies. The micromethod economizes the time and the tests. The statistical study of results obtained in the antibodies titration of 116 serums indicates that a very significant difference is between the two methods but also a very important connection. When the antibodies titration is applied to large numbers of sera, the microtest may be also utilized, because its advantages compensate its eventual deficiency of sensibility with regard to the classical method.

RESUMEN

Adaptación en microprueba de la técnica de seroneutralización por el método cinético para la búsqueda y el dosaje de los anticuerpos neutralizando el virus de la peste bovina

El autor describe una adaptación en microprueba de la técnica de seroneutralización del virus de la peste bovina por el método cinético mejorada por BOURDIN y BERNARD (1967). El análisis estadístico de los resultados obtenidos en 453 sueros de rumiantes probados cualitativamente a la vez por el método clásico y por la microprueba no permite evidenciar una diferencia entre los dos métodos que pues son canjeables y que se puede utilizar indiferentemente para la búsqueda cualitativa de los anticuerpos. El micrométodo tiene la ventaja de economizar tiempo y reactivos. El estudio estadístico de los resultados obtenidos en el dosaje de los anticuerpos de 116 sueros muestra una diferencia muy significativa entre los dos métodos pero también que una relación muy importante existe entre ellos. Cuando se hace el dosaje de los anticuerpos en grandes efectivos, se puede también utilizar la microprueba por que las ventajas que tiene compensan su falta eventual de sensibilidad en relación con el método clásico.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARSKY (G.) et LEPINE (P.). — **Microméthode de séro-neutralisation de la poliomyélite : emploi de cultures cellulaires sur plaques moulées en matière plastique.** *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 693-701.
2. BOURDIN (P.) et BERNARD (G.). — **Application de la méthode de séro-neutralisation cinétique à la recherche des anticorps neutralisant le virus de la peste bovine chez les bovins, les ovins et les caprins.** *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1967, **20**, 4, 531-536.
3. CASEY (L. H.). — **Adaptation of Laboratory Branch complement fixation method to microtechnique, dans « Standardized diagnosis complement fixation method and adaptation to Microtest », U. S. Department of Health Education and Welfare, U. S. Government Printing Office, Washington, 1965.**

4. MADIN (S. D.) et DARBY (N. B.). — Established kidney cell lines of normal adult bovin and ovin origine. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1958, **98**, 574.
5. RIOCHE (M.). — Rapport annuel 1968 du Laboratoire national d'Elevage et de Recherches vétérinaires, Dakar, 1969, 46 à 50.
6. SALIM (A. R.). — Neutralization of a Phlebotomus (Sandly) fever virus in Baby Hamster Kidney cells (BHK 21). Introduction of a simple microculture for plaque reduction tests. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 1967, **61**, 2, 259-264.
7. SEVER (J. L.). — Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immun.*, 1962, **88**, 320-329.
8. TAKATSY (G.). — The use of spiral loops in serological and virological micromethods. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1955, **3**, 191-203 (cité par Casey, L. H. et Sever J. L.).