

INSTITUT D'ELEVAGE ET DE MEDECINE
VETERINAIRE DES PAYS TROPICAUX

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

DAKAR-HANN

Zveco 1246

FIXATION DU COMPLEMENT PESTE EQUINE
MICROTECHNIQUE

Par G. BERNARD

Fixation du Complément Peste équine

Microtechnique

par G. BERNARD

Matériel spécial

- 1)-12 Microdilueurs de 0,025 ml
- 2)- 3 compte-gouttes de 0,025 ml
- 3)- Micro-plaques en U
- 4)- Porte plaques pour centrifugation
- 5)- Papier Go-No-Go pour contrôle des microdilueurs

Ce matériel fait partie du Microtiterkit produit par COOKE INSTRUMENTS, AG. Rahnhofstrasse 11 ZURICH (Suisse).

Préparation de l'Antigène

La fixation du complément Peste équine étant une épreuve de groupe et non de type, on pourra utiliser l'un quelconque des types. Néanmoins, le type 9-S2 convient particulièrement.

L'antigène est préparé sur cerveaux de souris âgées de 3 semaines environ.

On inocule à chaque souris 0,025 à 0,03 ml par voie i.c. d'une dilution au 1/10e dans du tampon phosphaté PH 7,4 (1) de la souche neurotrophe conservée lyophilisée à -25°C. Au bout de 3 à 4 jours, les souris arrivées au stade final (paralysie presque complète - symptômes nerveux très importants) sont anesthésiées. Après découpage de la boîte crânienne, les cerveaux sont récoltés et on leur fait subir une congélation. On prépare ensuite une suspension au 1/20e : 10 cerveaux + 12 ml tampon Veronal (2) que l'on broie dans un mixer (type Virtis ou Sorvall). La suspension est alors centrifugée 1 h à 10.000 t/m à + 4°C. Le surnageant représente l'antigène. Il peut être utilisé tel quel (le conserver à + 4°C) ou bien inactivé par du formol à 1/1000e (agitation pendant 48 h à temp. du labo) ou par 0,1 ml solution de Retapropiolactone à 0,1% dans de l'eau distillée pour 0,9 ml d'antigène (agitation de 3h A temp. du labo puis 18h à + 4°C).

Hématies

On utilise des hématies de **mouton** ,

Le sang est prélevé **dans** une quantité égale de Citrate de soude (3) ou de Alsever (4) . On le conserve 4 à 5 jours à + 4°C **avant** l'utilisation . Les hématies sont **alors lavées trois fois par** centrifugation (5 à 2500 t/m) . Décantation avec 2 à 3 Volumes de solution de Veronal-Gelatine (5) ou V G. **Le culot du dernier lavage est remis en suspension dans un volume égal de VG. Il peut être ainsi conservé une semaine** à + 4°C.

Sérum hémolytique

On utilise le serum de lapin anti hématies de mouton de l'Institut Pasteur . Il est conservé à 4 4°C et peut servir pendant **plusieurs mois** .

Dans **toutes** les épreuves, on utilise une solution d'hémolyse (SH) diluée au 1/1000e (une microgoutte de SH dans 12 ml de tampon VG) . On se trouve ainsi d'une manière certaine en excès d'hémolyse, condition nécessaire à l'exécution des réactions.

Préparation du stock d'hématies sensibilisées (SS - SH)

On prépare une suspension (appelée SS) à 3% d'hématies dans du tampon VG à laquelle " on ajoute, en effectuant un mouvement rotatif, un volume identique de SH (préalablement dilué au 1/1000e) . Après une incubation de 15' à temp. du labo, les hématies sensibilisées sont conservées à + 4°C et peuvent être utilisées pendant une semaine.

Préparation de la gamme d'hémolyse

II. est nécessaire de disposer d'une échelle étalon d'hémolyse (de 0 à 100%) avec laquelle des comparaisons pourront être faites lors des épreuves- ,

Pour cela, on prépare :

1°)- une solution d'hémoglobine (solution A) : 1 ml de SS + 7 ml d'eau bidistillée . Après agitation on ajoute 2 ml de solution de Veronal 5 fois concentrée ou V 5 (6) .

2°)- une suspension d'hématies (suspension B) : on ajoute 9 ml de VG à 1 ml de SS . On répartit dans 11 tubes à hémolyse :
Solution A : 0,0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8
0,9 - 1,00

Suspension B : 1,00 - 0,9 - 0,8 - 0,7 - 0,6 - 0,5 - 0,4 - 0,3 -
0,2 - 0,1 - 0,0

% d'hémolyse : 0 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100

Après agitation on reporte 5 gouttes à 0,025 ml de chaque pourcentage dans les cupules d'une micro-plaque. On centrifuge 5' à 1.500 t/m à + 4°C. On recouvre de cellophane adhésif et l'on peut conserver pendant plusieurs jours à + 4°C.

Titrage des différents constituants

I°) Titrage du complément

Le complément est conservé lyophilisé à -25°C (complément de Biolyon). Au moment de l'emploi, utiliser le dissolvant spécial, attendre la dissolution complète sans agiter. Ne pas utiliser moins de 10' après la reconstitution (temps nécessaire à la stabilisation). Immédiatement après utilisation le mettre à + 4°C où il peut être conservé plusieurs jours au mieux à - 25°C.

On utilise dans la réaction 5 unités de complément hémolyse 50%. On prépare deux solutions mères de complément dans du VG : l'une à I/250 (solution A) et l'autre à I/300 (solution B). Si le complément est très actif, préparer les solutions mères à I/400 et I/450.

Faire les dilutions suivantes en tubes à hémolyse :

Tube n°	I	2	3	4	5	6	7	8	
VG	0,60	0,55	0,50	0,40	0,60	0,55	0,50	0,40	
Solution A	→ 0,20	0,25	0,30	0,40	0,20	0,25	0,30	0,40	(solution B) ←

On effectue le titrage en quadruple sur une plaque, on reporte 4 **gouttes de 0,025 ml de chacun des tubes I à 8** et on ajoute 0,025 ml de SS - SH dans chaque cupule. Après agitation on met 30' à l'étuve à 37° avec agitation à la 15ème minute. Puis on centrifuge 5' à 1.500 t/m à + 4°C.

On lit les pourcentages d'hémolyse par comparaison avec la gamme. Les quatre titrages doivent donner des résultats identiques, **sinon prendre la moyenne.** On établit alors la courbe de titrage sur papier log. (voir schéma n°I) pour I/250 et I/300. Les points A-B-C-D de la courbe auront pour ordonnées le volume de complément dans les tubes I à 4 et 5 A 8 (pour I/300) et pour abscisses les valeurs qui correspondent aux pourcentages d'hémolyse **suivants** :

% d'hémolyse : 10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 60 - 70 80 - 90
 abscisses 0, 11,0, 43-0, 67-1, 100-1, 50-2, 33-4, 00-9, 00

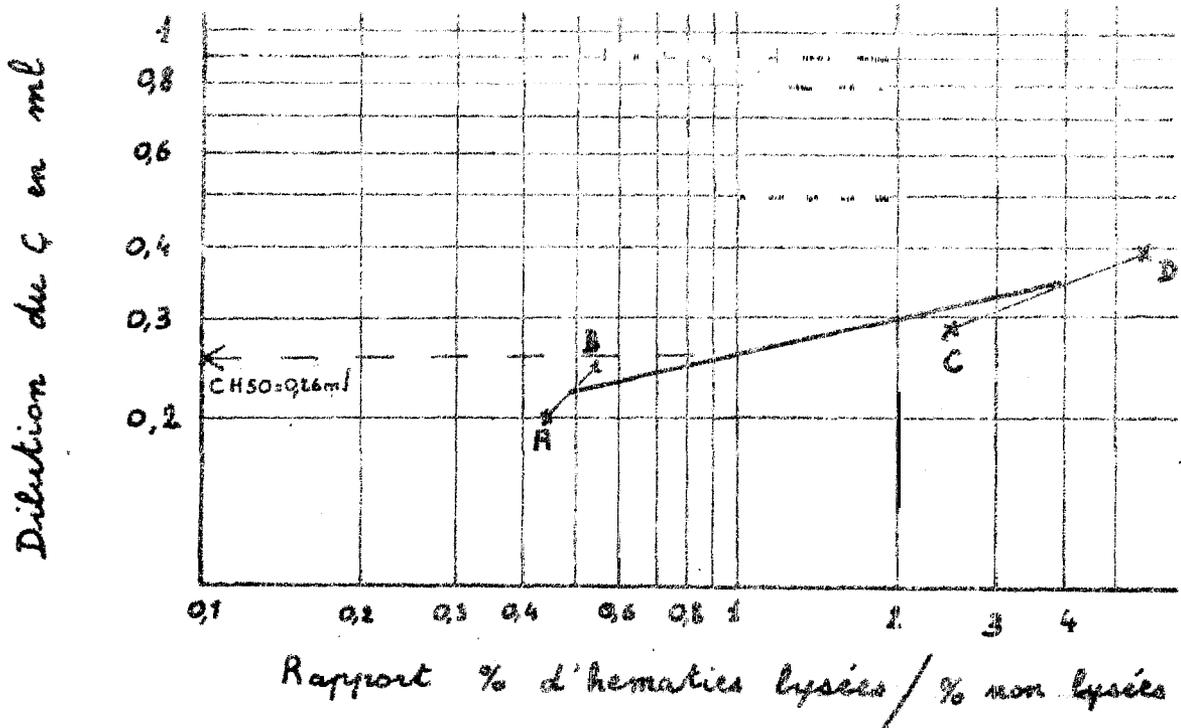


Schéma n° 1

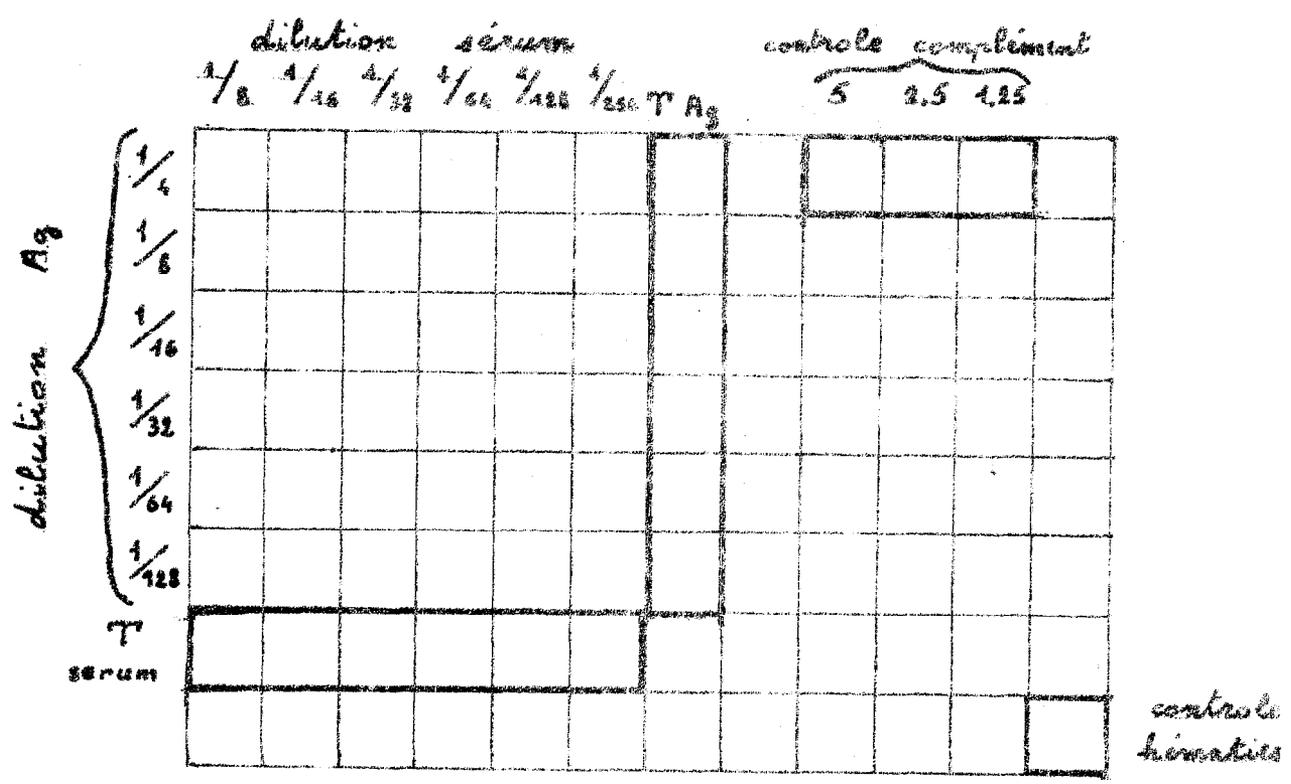


Schéma n° 2

Puis on joint d'une part AB et d'autre part CD. On trace la droite passant par le milieu de AB et de CD. Elle coupe la ligne log I,0 en un point dont l'ordonnée Y sert au calcul suivant :

$$\frac{5 \times Y}{250(\text{ou } 300)} = \frac{0,4}{X}$$

0,05 ml d'une dilution à I/X contiendront les 5 unités 50%.

2°) - Titrage de l'antigène

On va rechercher l'optimum antigénique c'est-à-dire la dilution d'antigène donnant le titre le plus élevé à un sérum positif connu. Pour cela, on va préparer d'une part une série de 6 tubes à hémolyse contenant les dilutions du sérum décomplémenté à 56°C (du I/8e au I/256e) et d'autre part une série de 6 tubes contenant les dilutions de l'antigène (du I/4e au I/128e). Toutes les dilutions seront faites en VG.

On utilise une microplaque (voir schéma n°2) dans laquelle on va distribuer dans 6 rangées verticales les dilutions du sérum, à raison de 0,025 ml par cupule et dans 7 cupules par rangée (la dernière qui est le témoin sérum sert à contrôler un éventuel pouvoir anticomplémentaire dans chaque dilution). Puis dans 6 rangées horizontales on distribue les dilutions de l'antigène à raison de 7 cupules par dilution soit 0,025 ml par cupule (la dernière étant le témoin antigène pour contrôler un éventuel pouvoir anticomplémentaire dans chaque dilution).

Toutes les dilutions sont distribuées en commençant par la plus élevée.

Dans les 2 rangées T Ag et T Serum on ajoute 0,025 ml de tampon VG par cupule.

On distribue 0,05 ml, de VG dans 3 cupules qui serviront de contrôle complément et 0,1 ml dans une cupule qui sera le témoin hématies.

On agite et on laisse 15' à température du labo. On prépare alors Zes dilutions du complément :

1)- à 5 unités : 6 ml selon la dilution déterminée par le titrage.

2)- à 2,5 unités : 1 ml à 5 unités + 1 ml de VG

3)- à 1,25 unités : 0,5 ml à 3 unités + 1,5 ml de VG

Après les 15' on distribue le complément (0,05 ml. par cupule) ;

1)- à 1,25 unités : dans la cupule contrôle 1,25

2)-à 2,5 unités : dans la cupule contrôle 2,5

3)-à 5 unités : dans toutes les autres cupules sauf celle du témoin hématies.

Après agitation, on place à + 4°C pendant 18 heures en recouvrant avec une autre plaque .

La plaque est remise ensuite à temp. du labo pendant 15' après quoi, on distribue dans toutes les cupules 0,025 ml de SS - SH. On met alors à l'étuve à 37°C pendant 1/2 heure (avec agitation à 15') puis on centrifuge 5' à 1500t/m à + 4°C.

On doit observer alors les pourcentage s suivants d'hémolyse dans les témoins :

Contrôle complément 5 unités :	100 %
" 2,5 unités:	90 - 100%
" 1,25 unités:	40 - 75%

Témoins Antigène	:	100%
Témoins Sérums	:	100%
Témoin Hematie	:	0%

Le titre de l'antigène sera donné par la dilution de l'antigène ayant donné le plus haut titre au sérum (courbe à 30% d'hémolyse) exemple : antigène titrant I/16e.

- L! . % -	Serum					
	I/8	I/16	I/32	I/64	I/128	I/256
I/4	0	0	30	70	100	100
I/8	0	0	10	50	90	100
I/16	0	0	0	20	60	90
I/32	0	0	10	40	70	100
I/64	0	0	30	80	100	100
I/128	0	30	50	100	100	100

Exécution de la Réaction de Fixation du complément

Les sérums à examiner sont dilués au I/4 dans du tampon VG (0,5 ml de serum + 1,5 ml de VG) dans des tubes à hémolyse et décomplémentés à 56°C pendant 30'.

On contrôlera pendant ce temps les microdilueurs. Ils sont passés à la flamme, sans les chauffer jusqu'à l'incandescence. On laisse refroidir puis on les trempe dans de l'eau distillée sans mouiller la tige ; après plusieurs rotations on applique chaque dilueur au centre d'un cercle sur un papier Go-No-Go correspondant au volume du microdilueur utilisé. La totalité du cercle doit être humectée. Dans le cas contraire, recommencer les opérations précédentes.

On distribuera pour chaque sérum 0,025 ml de tampon VG dans 4 cupules d'une rangée verticale (les trois premières contiendront des dilutions du serum allant du I/8e au I/32e et la 4e servira de témoin sérum afin de contrôler un Eventuel: anticomplémentaire). Dans la pratique, on pourra, par plaqué, faire deux séries de 12 sérums.

On prend 4 microdilueurs que l'on tient entre le pouce et l'index des deux mains et que l'on trempe (sans mouiller la tige) dans 4 sérums (dilués au I) après une légère rotation on porte les 4 microdilueurs dans les premières cupules de 4 rangées verticales (on a ainsi une dilution au I/8e). Après rotation, on passe aux 2èmes cupules des 4 rangées, puis aux 3èmes. On retrempe alors les 4 dilueurs dans les 4 dilutions initiales au I/4 et on les porte dans les 4èmes cupules des 4 rangées verticales (témoins anticomplémentaire au I/8e). Le témoin Anticomplémentaire n'est réalisé qu'au I/8e par commodité, les sérums de chevaux nu contraire de ceux des anes étant très rarement anticomplémentaires. Les 4 microdilueurs sont alors rincés à l'eau distillée et passés à la flamme. Pendant le refroidissement, on en utilise 4 autres (3 séries de 4 sont ainsi nécessaires). Lorsque tous les sérums sont passés, on distribue dans chaque cupule témoin (la 4ème de chaque rangée verticale., 0,025 ml de tampon VC. Distribuer 0,05 ml de VG dans 3 cupules qui serviront de témoin complément (5 - 2,5 et 1,25 unités) et 0,1 ml dans une cupule témoin hématies.

Préparer l'antigène à la dilution donnée par le titrage et en distribuer 0,025 ml dans chaque cupule réaction (les 3 premières de chaque rangée verticale). Après agitation on laisse 15' à temp. du labo.

On prépare alors le complément à la dilution voulue pour avoir 5 unités (ne pas oublier de faire des dilutions à 2,5 et 1,25 unités) .

On distribue 0,05 ml à 1,25 U dans la cupule témoin correspondant, 0,05 ml à 2,5 U également et 0,05 ml à 5 unités dans toutes les autres cupules sauf dans le témoin hématie . Après agitation, on recouvre par une autre plaque et l'on met à + 4°C pendant 18 h . Les plaques sont alors sorties et laissées 15' à temp .du labo puis on distribue dans toutes les cupules 0,025 ml de SS - SH .

Après agitation les plaques sont mises 30' à l'étuve à 37°C (agitation à la 15ème minuta), puis elles sont centrifugées 5' à 1.500t/m à + 4°C.

Le titre des sérums est indiqué par la dilution la plus élevée donnant de 0 à 30% d'hémolyse.

Interprétation des Résultats

On considère en matière de Peste Equine que le 1/8e en microfixation du complément est la limite inférieure pour un taux d'anticorps significatif. D'autre part, ce taux est très rarement supérieur nu 1/32e ou 1/64e, ce qui explique la zone du 1/8e au 1/32e utilisée dans l'épreuve.

Nettoyage du matériel

Les microdilueurs sont passés A l'eau distillée puis séchés à la flamme.

Les micropipettes sont rincées plusieurs fois à l'eau claire puis à l'eau distillée. Or: peut les faire sécher à l'étuve à 37°C.

Les microplaques sont mises immédiatement après usage dans un récipient contenant de l'eau claire. L'eau est changée 2 ou 3 fois et on laisse tremper une nuit après quoi les plaques sont passées sous un fort jet d'eau que l'on fera pénétrer dnns chaque cupule. On rince une dernière fois à l'eau distillée et l'on peut faire sécher à l'étuve à 37°C.

Milieux utilisés

1-Tampon phosphaté pH 7,4

- Phosphate disodique (Na_2HPO_4) anhydre 3,20 g
 - Phosphate monosodique ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) cristallisé .. 0,39 g
 - Chlorure de sodium 6 g
 - Eau bidistillée Q.S.P. 1000 ml
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

2-Tampon Veronnl

- 1 comprimé "complément Fixation test diluent tablets" (OXOID)
 - Eau bidistillée 1 Me 8 100 ml
- Dissoudre à chaud.

3-Citrate de soude

- Citrate trisodique ($2\text{H}_2\text{O}$)..... 3,8 g
 - Eau bidistillée Q.S.P..... 100 ml
- Autoclave à 110°C pendant 20 minutes.

4-Solution de ALSEVER

- Glucose*a.....*...*.* 0. 20,5 g
 - Citrate de soude 8 g
 - Ac. citrique 0,55 g
 - Chlorure de sodium 4,2 g
 - Eau bidistillée Q.S.P..... 1000 ml
- Autoclaver à 110°C pendant 20 minutes.

5-Solution de Veronal Gelatine (VG)

- 10 comprimés OXOID
 - Gelatine 1 g
 - Eau bidistillée Q.S.P..... 1000 ml
- Dissoudre au bain-marie à chaud.

6-Solution de Veronal 5 fois concentrée (VB)

-1 comprimé "OXOID" dans 20 ml d'eau bidistillée .

Dissoudre à chaud, refroidir, compléter à 20 ml, conserver à +4°C.