ZVccc-1268

11/14

1268

REPUBLIQUE DU SENEGAL
-m-v----

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

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

DAKAR-HANN

ETUDE DE LA PROTECTION DES CAPRINS
CONTRE LA PESTE DES PETITS RUMINANTS
APPLICATION DE L'IMMUNODIFFUSION RADIALE
A NIASS, S. CISSOKHO, P. BOURDIN

mars 1979

ETUDE DE LA PROTECTION DES CAPRINS
CONTRE LA PESTE DES PETITS RUMINANTS
APPLICATION DE L'IMMUNODIFFUSION RADIALE

A NIASS, S. CISSOKHO, P. BOURDIN

I - INTRODUCTION

S'il est avantageux d'utiliser la microméthode de neutralisation cinétique (possibilité de tester plusieurs sérums en une manipulation), il est évident par contre que cette technique présente des inconvénients. Outre la série de préparations préalables (culture des cellules, titrage du virus, etc...), l'inconvénient majeur réside dans la longue attente des résultats (6 jours).

Le but de ce présent travail est d'appliquer l'immunodiffusion radiale en comparaison avec la séroneutralisation cinétique dans la recherche d'anticorps maternels contre la peste des petits ruminants et l'accroissement du taux d'anticorps après vaccination.

Cette même technique servira à la révélation de séroneutralisation.

II - MATERIEL ET METHODE

Séroneutralisation cinétique

La technique de séroneutralisation cinétique est décrite en 1967 par P. BOURDIN et col. (2).

Brièvement, les cupules reçoivent 0,15 ml de chacune des dilutions suivantes du sérum 1/2, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 puis 0,15 ml de virus bovipestique souche III B titrant 1 DICT 100/ml. Ce qui ramène les dilutions des sérums à 1/4, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128.

.../...

Ces mélanges virus-sérums sont incubés à 37°C à l'étuve. Après une heure de contact, il est ajouté à chaque complexe antigène-anticorps 0,15 ml de cellules MDEK (3) dont la concentration est de 100 000 cellules par millilitre. 4 % de sérum foetal de veau est mis dans toutes les cupules où la dilution du sérum est supposée insuffisante pour la bonne croissance des cellules.

Des témoins cellules, virus et sérums accompagnent chaque série de manipulations.

IMMUNODIFFUSION RADIALE (IDR)

Préparation de la gélose - antigène et titrage des anticorps (1,7)

A 25 ml de tampon de composition suivante :

Veronal sodique (0,05 M)	10,309
Veronal acide (0,01 M)	1,842
Acétate de sodium anhydre	4,102
Eau distillée q.s.p.	1 000

On ajoute 75 ml d'eau distillée et 2 grammes d'indubiose A₃₇. Porté à ébullition, ce mélange reçoit de l'azide de sodium à 1/10 000 puis est réparti dans des tubes à raison de 10 ml/tube.

En temps opportun, la gélose est fondue au bain-marie et est ramenée à 55°-60°C. A 10ml de gélose on ajoute 0,2 ml de virus bovipestique III B soit l'équivalent de 10 doses vaccinales.

Le mélange gélose-antigène ainsi obtenu est coulé sur lame ayant reçu préalablement une mince couche adhésive. Dès sa solidification, des cupules de 2 mm de diamètre sont creusées et reçoivent les différentes dilutions des sérums à tester ou des complexes virus-sérums pour le titrage des anticorps résiduels.

L'incubation se fait en chambre humide à + 4°C pendant 24-48 heures.

LECTURE DES RESULTATS DE L'IDR

Pour une bonne interprétation des résultats, 2 lectures sont faites. Une première au bout de 24 heures et une deuxième après 48 heures d'incubation, suivie de la coloration des lames.

colorant : le colorant utilisé est le noir amido de composition suivante :

Noir amido 10 B	0,1 gr.
Acide acétique glacial	10 ml
Méthanol	70 ml
Eau distillée	20 ml

Le différenciateur

Acide acétique glacial	10 ml
Méthanol	70 ml
Eau distillée	20 ml

Technique de coloration

Après 48 heures d'incubation, les lames sont immergées dans une solution à 8 % de ClNa pendant 4 heures.

Un séchage sous papier buvard à 37°C s'en suit. Les lames ainsi séchées sont plongées dans le colorant pendant 10 minutes puis on fait agir le différenciateur très rapidement.

Un deuxième séchage à l'air libre met fin à la coloration.

Les couronnes de précipitation se colorent intensément alors que la surface libre des lames reste presque incolore.

.../...

Sérums à tester

Les sérums à tester proviennent d'un troupeau très hétérogène du point de vue âge. Nous avons isolé 3 groupes se répartissant et se caractérisant comme suit :

groupe A : Chevreaux moins de 2 mois jamais vaccinés et jamais malades de la peste des petits ruminants ;

groupe B : Chevreaux de 2 à 3 mois d'âge non vaccinés et n'ayant pas fait de maladie .

Les groupes A et B proviennent de mères vaccinées 3 mis avant la mise-bas ;

groupe C : Chèvre de plus de 2 ans dont la dernière vaccination date de plus d'un an. Une première prise de sang nous donnant un sérum initial (S_0) est faite sur tous les animaux, elle est suivie de la vaccination.

Les prises de sang après vaccination sont effectuées à la fin de la 1ère, 2ème et 3ème semaine.

III - RESULTATS

Les résultats obtenus figurent dans les tableaux I et II.

• Persistance des anticorps maternels

Comparant le S_0 des groupes A et B du tableau I, il est constaté que les anticorps maternels anti-PPR aussi bien neutralisants que précipitants, persistent chez les chevreaux jusqu'à l'âge de 2 mois et disparaissent au-delà. Aussi, peut-on remarquer que les taux décelés en séroneutralisation comme en immunodiffusion radiale sont bien inférieurs à la quantité optimale protectrice. Cette quantité se situe entre le 1/20 et le 1/40.

Tableau n° I

	Sérum	S ₀	S1	s2	s3	ST*
	groupe d'âge					
Recherche d'anticorps maternels et accroissement du taux d'anticorps après vaccination en séroneutralisation cinétique	A	1/4	1/16	1/64	1/128	0
	B	0	1/8	1/32	1/64	0
	C	1/8	1/32	1/64	1/128	0
Anticorps maternels et accroissement du taux d'anticorps après vaccination en IDR.	A	1/2	1/8	1/32	1/64	0
	B	0	1/4	1/16	1/32	0
	c	1/4	1/16	1/32	1/64	0

* ST = Sérum témoin de chèvres adultes saines et jamais vaccinées.

- Accroissement du taux d'anticorps après vaccination (voir tableau I)

On notera que dans chaque groupe d'âge, l'augmentation du taux d'anticorps neutralisants ou précipitants est régulière. Ainsi dès la deuxième semaine après la vaccination, le taux minimum protecteur d'anticorps est atteint ou même dépassé.

- Immunodiffusion radiale - Système révélateur de neutralisation

Habituellement une séroneutralisation nécessite un substrat biologique vivant : animaux de laboratoire, oeufs embryonnés, cellules vivantes de lignée ou de premier explantation.

Dans ce travail, nous avons utilisé l'immunodiffusion radiale pour révéler l'action d'un virus sur le sérum spécifique. Ainsi les sérums S3 des groupes A, B et C dilués dans du PBS d'une part et d'autre part dans une suspension virale titrant 1 Dict 100/ml ont présenté des titres précipitants différents de 2 à 3 dilutions comme l'indique le tableau II.

.../...

Tableau II

	S3 + Virus	S3 + PBS	ST + Virus	ST + PBS
A	1/16	1/64	0	0
B	1/8	1/32		
C	1/8	1/64		

ST = Sérum témoin de chèvre non vaccinée, non malade.

IV - DISCUSSION

1 - Persistance des anticorps maternels

La forte mortalité des chevreaux au cours des épidémies de P.P.R. a pour origine la rapide disparition des anticorps maternels.

Cette sensibilité se retrouve également chez les adultes vaccinés depuis plus d'un an et n'ayant pas reçu de rappel vaccinal.

2 - Montée des anticorps maternels

Il ressort des résultats obtenus que l'augmentation des anticorps est régulière après vaccination dans tous les groupes mis est plus rapide après le rappel. Ainsi, au bout de deux semaines, les animaux de tous âges sont immunisés.

La séroneutralisation nous donne des titres plus élevés. Ce qui **encore** une fois confirme sa plus grande sensibilité mais la rapidité des résultats de l'IDR et la simplicité de sa réalisation présentent bien des **avantages** :

.../...

3 - Aptitude de l'I.D.R. à révéler une neutralisation

Le test de précipitation peut être utilisé pour titrer les anticorps résiduels après contact sérum-virus. En effet la réaction entre virus et sérum ou entre déterminants antigéniques et sites anticorps à 37°, est reflétée par une absence de précipitation entre sites anticorps et déterminants antigéniques inclus dans la gélose. La question posée est de savoir si cette révélation de la neutralisation par l'absence de précipitation est due par une non diffusion des complexes formés, de taille plus grosse que les mailles de la gélose ou par défaut de sites anticorps libres diffusant dans la gélose.

CONCLUSION

A l'issue de ce travail, nous recommandons la vaccination systématique du cheptel caprin dès le second mois de la vie et de procéder à des rappels annuels afin de prémunir ces animaux contre la PPR.

Il ressort aussi des résultats obtenus, que l'immunodiffusion radiale pourrait être appliquée dans bien des travaux d'enquêtes sérologiques et par conséquent dans le diagnostic rétrospectif des maladies où les anticorps créés ont ^{la} propriété de précipiter.

A défaut de substrat biologique vivant et dans le cas de la peste des petits ruminants, une séroneutralisation est toujours réalisable grâce à la technique de l'immunodiffusion radiale.

R E S U M E

Les techniques de séroneutralisation cinétique (S.N.C.) et de l'immunodiffusion radiale sont comparées dans la recherche d'anticorps anti-PPR (peste des petits ruminants) chez les jeunes chevreaux. Bien que de sensibilité inférieure à celle de la S.N.C., l'I.D.R. est plus facilement réalisable et présente l'avantage d'être un test rapide. Elle est également utilisable pour l'évaluation quantitative d'anticorps résiduels après action du virus sur le sérum.

Par ces deux tests, il a été montré que la forte mortalité des jeunes chevreaux au cours des épidémies de peste des petits ruminants, a. pour origine le taux très faible des anticorps maternels et leur rapide disparition au bout d'un mois.

Cette absence de **protection** contre la PPR se retrouve chez les caprins adultes, vaccinés depuis plus d'un an, qui par défaut de vaccination de rappel, ont **un faible taux d'anticorps circulants** et retrouvent leur sensibilité au virus.

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

- 1 - CUNNINGHAM (M.P.), BAILEY (N.M.) et KIMBER (C.D.) - Dosage des Immunoglobulines IgM sur sang desséché comme épreuve préliminaire pour le dépistage de la trypanosomiase humaine. OMS Tryp. Inf./66.10.

- 2 - BOURDIN (P.) et BERNARD (G.) - Application de la méthode de séroneutralisation 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., 20 (4), 531-536, 1967.

- 3 - MADIN (S.D.) et DARBY (N.B.) (2958 - Establishment kidney cellules of normal adult bovin and ovine origine. Proc. Soc. Exp. Bio. Méd. 98, 574.

- 4 - MOROT (P.), GILBERT (Y.), ORUE (J.), THIERY (G.) et SOW (M.) - La Peste des petits ruminants en Afrique occidentale française : ses rapports avec la peste bovine. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1956, 9 pp. 313-342.

- 5 - SCHILD (G.C.) ad al. - The use of transportable single, radial-diffusion immunoplates in seroepidemiological studies of influenza in the Gambia. J. Gen. Vir., 16 : 231-236 (1972).

- 6 - FAHEY (J.L.) et MCKELVEY (E.M.) (1965) - Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. J. Immunol., 94 (1) : 84-90.