

ARTICLES ORIGINAUX

Les réactions d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination avec le virus de la peste équine.

Limites de leur interprétation.

par Y. MAURICE et A. PROVOST

RÉSUMÉ

Les auteurs ont montré l'influence des différents paramètres entrant en jeu dans les réactions d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination avec le virus de la peste équine : antigène, globules rouges, pH, protamine, tampon. Au terme de cette étude ils constatent qu'un certain nombre d'exigences doivent être respectées pour que ces deux réactions aient toute leur valeur.

En 1961, et 1963 PAVRI (3) puis PAVRI et ANDERSON (4) ont montré la propriété hémagglutinante du virus de la peste équine et la spécificité de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination. En 1964, cette réaction a été utilisée au Laboratoire de Farcha pour une enquête sérologique. Il s'est alors avéré que cette technique d'investigation était délicate. En effet, pour que la réaction d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination rende des services en matière d'investigation sérologique dans la peste équine, elle doit être conduite avec rigueur en respectant certaines exigences techniques. Les limites bien précises de cette réaction ont été étudiées et l'accent a été mis sur l'importance revenant à chacun des paramètres de la réaction. Les résultats de ces observations forment l'objet de cette note.

En effet, la préparation des antigènes entrant dans la réaction d'hémagglutination due au virus de la peste équine est, pour certains types de virus, tributaire de protamine ; sa présence gêne considérablement la lecture de l'agglutination directe. C'est ainsi que l'agglutination optimale du virus de la peste équine

se fait à pH 6,4, mais à ce pH et surtout aux pH inférieurs à 6,4 la protamine possède une propriété agglutinante pour les globules rouges de cheval. Dans cette étude il a été recherché en particulier la part exacte revenant à la protamine dans ce phénomène ainsi que dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

MATÉRIEL

1^o Le virus : Les virus de type 9 (souche 89/61), 6 (souche 114), 1 (souche A 501), et 2 (souche OD) ont été utilisés.

2^o Les antigènes : Après inoculation des souches de virus par voie intracérébrale, les antigènes ont été préparés à partir de cerveaux de souris ou de souriceaux nouveau-nés et de cerveaux de cobayes, morts de peste équine ou prélevés au stade final de la paralysie.

3^o Les globules rouges : Des globules rouges de cheval, de bœuf, de moutons, de chèvre, de porc, de poule, de lapin, de rats, de cobayes, de souris et d'oie ont été utilisés.

4^o Les sérums : Pour effectuer les réactions

d'inhibition de l'hémagglutination les sérums à examiner sont traités systématiquement par une suspension à 25 p. 100 de kaolin lavé aux acides, suivant la technique de CLARKE et CASALS (1), pour épuiser les inhibiteurs non spécifiques. L'extraction au kaolin a été retenue parce qu'elle est réputée donner d'aussi bons résultats que l'extraction à l'acétone et qu'elle est beaucoup plus commode à réaliser.

LES TECHNIQUES

1° Les antigènes : Les antigènes suivants ont été essayés :

— antigène au fréon 113 obtenu en utilisant la technique que PORTEFIELD et ROWE (5) emploient pour la préparation des antigènes fixant le complément avec les arbovirus ;

— antigène de Delpy pour les virus Cox-sackie (2) ;

— antigènes acétone-éther, acétone-éther-protamine, alcalin 10 p. 100 et 20 p. 100, alcalin-protamine, sucrose-acétone, sucrose-acétone-protamine.

Ces six derniers antigènes ont été préparés suivant la technique de CLARKE et CASALS (1) mais le taux d'agglutination maximum avec l'antigène sucrose-acétone a été obtenu en utilisant une technique légèrement modifiée. Cette méthode est celle employée à l'Institut Pasteur de Dakar pour l'étude de certains arbovirus ; c'est également la technique utilisée à l'East African Virus Research Institute. Quant à l'antigène au fréon 113 et l'antigène de Delpy, ils ont été préparés en suivant les techniques décrites par ces auteurs.

Les dilutions d'antigènes ont été faites en tampon phosphate pH 9 ou en tampon pH 9 à 0,4 ou 0,2 p. 100 d'albumine.

2° Les globules rouges et le pH : On utilise des concentrations de 0,3 p. 100, 0,4 p. 100 ou 0,5 p. 100 de globules rouges en suspension dans un tampon phosphate tel qu'après addition d'un volume égal d'antigène la réaction ait lieu au pH 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7, 7,2.

3° La température d'incubation : L'expérimentation a été conduite à des températures de + 4 °C, 25 °C, 37 °C pendant des temps varia-

bles. La réaction est faite soit en tube sous le volume total de 0,8 ml, soit en plaque de plexi-glass sous le volume total de 0,4 ou 0,8 ml.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. — Réaction d'hémagglutination

1° Nature de l'antigène :

Seuls les antigènes sucrose-acétone-protamine et alcalin-protamine ont donné des résultats positifs et ceci uniquement avec les types 9 (89/61), 6 (114) et 1 (A501). Le maximum d'agglutination s'observe après une heure et demie d'incubation à 37 °C. L'antigène sucrose-acétone-protamine à 5 mg de protamine par ml d'antigène préparé à partir de cerveaux de souris morts de peste équine à type 1, permet d'obtenir des agglutinations aux dilutions 1/256 voire même 1/512. L'antigène souris est meilleur que l'antigène extrait de cerveaux de souris ou de cobayes.

2° Influence des globules rouges :

Seuls les globules rouges de cheval sont agglutinés par le virus de la peste équine (tableau I). La concentration optimale pour la lecture de la réaction est 0,4 p. 100 de globules rouges.

3° Influence du pH :

L'agglutination est toujours maximum, quel que soit le type de virus, au pH 6,4.

4° Influence de la température d'incubation :

La température de 37 °C représente la température optimale pour les réactions d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination.

5° Influence de la protamine.

La préparation de la plupart des antigènes de la peste équine pour la réaction d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination étant tributaire du traitement à la protamine, on a voulu connaître la part exacte revenant à la protamine et au virus lui-même dans ces deux réactions.

TABLEAU N°I
Influence de la nature des globules rouges

Ag. \ G.R.	Cheval	Boeuf	Oie	Mouton	Chèvre	Porc	Poule	Lapin	Rat	Cobaye	Souris
Ag Fluorocarbène	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ag Acétone éther	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ag Acétone éther protamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ag Sucrose acétone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ag Sucrose-acétone protamine	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ag alcalin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ag alcalin protamine	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU N°II

Influence de la dose de protamine et du pH sur l'action hémagglutinante de la protamine.

pH \ Ag	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Témoin GR
pH 6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
pH 6,2	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
pH 6,4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	±	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
pH 6,6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
pH 6,8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
pH 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Notation : + hémagglutination totale; ± traces d'hémagglutination.
- Réaction effectuée avec un antigène témoin souris alcalin 20 p.100
Diluant albumine à 0,4 p.100
- 1ère ligne : 1,25 mg de protamine par ml d'antigène
- 2è " : 2,25 " " " " "
- 3è " : 3,75 " " " " "
- 4è " : 5 " " " " "
- 5è " : 6,25 " " " " "

TABLEAU N°III

Influence de la qualité de la protamine, du pH et de l'âge des souris servant à la préparation de l'antigène.

	Ag	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Témoin G.R
pH 5,75	protamine 1	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 2	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 3	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 4	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
pH 6	protamine 1	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 2	souris -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 3	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 4	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
pH 6,2	protamine 1	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 2	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 3	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 4	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
pH 6,4	protamine 1	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 2	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 3	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 4	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
pH 6,6	protamine 1	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 2	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 3	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 4	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
pH 6,8	protamine 1	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 2	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 3	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 4	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
pH 7	protamine 1	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 2	souris -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 3	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
	protamine 4	souris +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
		souriceau +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-

Notation : + = agglutination totale ; - = absence d'agglutination.

a) Influence de la quantité de protamine utilisée dans la préparation de l'antigène sucrose-acétone-protamine et alcalin-protamine.

Des cerveaux de cobayes ou de souris non inoculés avec le virus de la peste équine subissent le traitement sucrose acétone ou le traitement alcalin. Les préparations ne montrent aucune propriété agglutinante pour les globules rouges de cheval après une heure et demie d'incubation à 4 °C, 25 °C et 37 °C, ceci aux pH 5,75, 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7 et 7,2, que l'antigène soit pur ou dilué ; dans ce cas le taux de dilution ou la nature du diluant (tampon phosphate à pH 9, tampon pH 9 albuminé à 0,4 ou 02 p. 100) n'ont aucune influence.

A partir de cerveaux de cobayes et de souris non inoculés avec le virus de la peste équine, ont été préparés également des antigènes témoins alcalin-protamine et sucrose-acétone-protamine en utilisant respectivement 1,25, 2,5, 3,75, 5 et 6,25 mg de protamine par ml d'antigène ; les dilutions d'antigènes ont été faites en tampon albumine. Les résultats sont rapportés dans le tableau II. Les résultats sont identiques que l'antigène provienne de cerveau de souris ou de cobaye, que cet antigène soit préparé suivant la technique sucrose-acétone-protamine ou alcalin-protamine.

Si l'on consulte le tableau de PAVRI et ANDERSON (4) une constatation s'impose. Le titrage des types de virus à faible titre hémagglutinant et exigeant de surcroît de la protamine lors de la préparation des antigènes (type 5 par exemple) est impossible à réaliser dans ces conditions à moins de supprimer par un artifice quelconque l'action hémagglutinante de la protamine.

b) Influence du pH : Il a été préparé plusieurs antigènes témoins cerveau de cobaye et cerveau de souris non inoculés de peste équine. Ces antigènes, préparés suivant la technique sucrose-acétone et alcalin 10 et 20 p. 100, ont été traités à la protamine. Quelles que soient les quantités de protamine utilisées dans les limites précédentes (1,25 à 6,25 mg par ml d'antigène), l'action hémagglutinante de cette substance est d'autant plus élevée que le pH est bas. Le tableau II donne déjà une idée du rôle du pH. Ainsi au pH 6,4, pH optimum de la réaction d'hémagglutination avec le virus de la peste équine, la protamine utilisée a une action hémagglutinante

certaine. Lorsque l'on utilise ce même lot de protamine l'action hémagglutinante se manifeste de façon constante et régulière dans tous les essais. Le tableau III met également en relief l'influence du pH.

c) Influence de la qualité de la protamine utilisée : Plusieurs lots de protamine ont été utilisés pour apprécier l'influence de l'origine du produit. L'antigène utilisé est un antigène alcalin 20 p. 100 à 5 mg de protamine par ml d'antigène. Des cerveaux de souris et de souris non inoculés ont été employés. La réaction a été effectuée sans tampon albumine, uniquement avec un tampon phosphate à pH 9. Les globules rouges sont des globules rouges de cheval en suspension à 0,5 p. 100. L'incubation a été d'une heure et demie à 37 °C. Les protamines utilisées dans ces expériences sont les suivantes :

- Protamine 1 : Sulfate de protamine « Hereng » (*).
- Protamine 2 : Sulfate de protamine U. S. P. (**).
- Protamine 3 : Sulfate de protamine B. D. H. (***)
- Protamine 4 : Sulfate de protamine B. D. H. mais lot différent du 3.

Comme on peut le constater à la lecture du tableau III, la protamine utilisée dans la préparation des antigènes hémagglutinants ne convient pas toujours. Le degré de pureté de cette substance intervient vraisemblablement dans ses propriétés agglutinantes. Ainsi les protamines 1 et 4 sont à éliminer dans la préparation d'un antigène hémagglutinant. Le lot de protamine 3 pourra être utilisé avec précaution, il devra être titré avec précision de façon à connaître la part exacte de celle-ci dans l'agglutination. Par contre, le lot de protamine 2 convient très bien pour une telle réaction puisqu'en effet on n'observe aucune agglutination avec un antigène de cerveau de souris lorsque la réaction a lieu aux pH supérieurs à 6, en particulier au pH 6,4.

(*) Serlabo, 26, rue Saint Gilles, Paris 3^e.

(**) Mann Research Laboratories.

(***) B. D. H. Ltd., Poole, Angleterre.

TABLEAU N°IV

Influence de la température d'incubation sur l'action hémagglutinante de la protamine

Antigène	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Témoin GR
pH	37°C	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	-	-
	25° C	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	-	-	-
6,4	4° C	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	-

TABLEAU N°V

Influence de la nature du diluant sur l'action hémagglutinante de la protamine (antigène cerveau souris alcalin 20 p.100 protamine)

Antigène	1/1	1/2	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Témoin GR
Diluant albumine 0,4p.100	+	+	+	±	-	-	-	-	-
6,4 Diluant tampon phosphate pH 9	+	+	+	+	+	+	-	-	-

TABLEAU N°VI

Influence de l'héparine sur l'action hémagglutinante de la protamine.

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Témoin G.R.
Cerveau souris sans protamine (Diluant tampon pH 9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Globules rouges non formolés (Diluant albumine à 0,4p.100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerveau souris sans protamine (Diluant tampon pH 9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Globules rouges formolés (Diluant albumine à 0,4p.100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerveau souris traité à la protamine 3mg/ml d'antigène (Diluant tampon pH 9)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Globules rouges non formolés (Diluant albumine à 0,4p.100)	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerveau souris traité à la protamine 3mg/ml d'antigène (Diluant tampon pH 9)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Globules rouges formolés (Diluant albumine à 0,4p.100)	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
Cerveau souris Témoin traité à la protamine 3mg/ml d'antigène (Diluant tampon pH 9)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Globules rouges formolés + Héparine (à 0,4p.100) (Diluant albumine à 0,4p.100)	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-

d) Influence de l'âge des animaux servant à la préparation de l'antigène.

Les résultats comparatifs obtenus, en utilisant des souriceaux et des souris adultes sont rapportés également dans le tableau III. Les souriceaux utilisés dans cette expérience sont des souriceaux de 4 à 5 jours. Avec des souriceaux plus âgés (huit jours et plus) l'agglutination non spécifique est de plus en plus élevée et à partir de 15 à 20 jours elle correspond à celle de l'antigène préparé avec du cerveau de souris adultes.

On voit tout l'intérêt qu'il y a d'utiliser le souriceau nouveau-né ; d'une part, le titre en virus du cerveau est plus élevé, donc le titre hémagglutinant est supérieur, d'autre part l'agglutination non spécifique due à la protamine est moins marquée qu'avec le cerveau de souris adulte.

e) Influence de la température d'incubation :

On prépare un antigène alcalin 10 p. 100 protamine (5 mg par ml d'antigène) à partir d'un cerveau de souris non inoculée de peste équine. Les dilutions d'antigène sont faites en diluant albumine à 0,2 p. 100. La réaction est lue une heure et demie après l'addition de globules rouges de cheval à 0,5 p. 100, l'incubation étant faite à 4 °C, 25 °C et 37 °C. On constate qu'à 4 °C l'action hémagglutinante de la protamine est légèrement moins élevée qu'à la température ordinaire et qu'à 37 °C. Comme on le verra plus loin cette observation a une application pratique dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination. Ces résultats sont rapportés dans le tableau IV : ne sont mentionnés sur ce tableau que les résultats obtenus à pH 6,4. En effet, aux pH 5,75, 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7 et 7,2, les différences observées à 4 °C, 25 °C et 37 °C sont de même ordre.

f) Influence du temps de lecture :

L'agglutination non spécifique est stable. Une fois les tubes ou les plaques sortis de l'étuve, ou du réfrigérateur, la lecture donne les mêmes résultats après une, deux, trois ou plusieurs heures.

g) Influence du tampon de dilution de l'antigène :

Si les réactions d'agglutination sont effectuées avec le même lot d'antigène, de protamine et

de globules rouges de cheval, on constate que, pour un même temps et une même température d'incubation, le titre d'agglutination dû à la protamine est beaucoup plus élevé avec un diluant phosphate pH 9 qu'avec le même diluant à 0,4 p. 100 d'albumine. Le tableau V met en évidence cette constatation. Ne sont mentionnés sur ce tableau que les résultats obtenus à pH 6,4. En effet, aux pH 5,75, 6, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7 et 7,2, les différences observées avec les deux diluants sont du même ordre de grandeur.

Utilisant un même lot et une quantité égale de protamine ces résultats sont toujours vérifiés, que l'on utilise un antigène préparé à partir de cerveau de souris ou de cobaye, que la technique de la préparation de l'antigène soit celle de l'antigène sucrose-acétone-protamine ou alcalin-protamine. Les dilutions de l'antigène en tampon albumine réduisent donc considérablement cette hémagglutination de nature non virale.

L'influence de la quantité d'albumine a été également étudiée. Il était intéressant en effet de voir si en augmentant la quantité d'albumine dans le diluant l'agglutination non spécifique n'allait pas aller en diminuant. Malheureusement l'on constate qu'il y a un seuil d'action de l'albumine qu'on ne peut dépasser. Ainsi les résultats sont pratiquement les mêmes, que l'on utilise un diluant à 0,1, 0,2, 0,35, 0,45, 0,6, 0,8, 1,2 et 1,6 p. 100 d'albumine. C'est pourquoi dans la pratique on utilise 0,2 à 0,4 p. 100 d'albumine dans le diluant. Quels que soient le pH et la nature de l'antigène, la quantité d'albumine, au-dessus de 0,2 p. 100, ne semble pas influencer sur l'agglutination non spécifique due à la protamine.

h) Influence de la nature des globules rouges :

— Les propriétés hémagglutinantes du virus de la peste équine n'ont pu jusqu'à ce jour être mises en évidence qu'avec les globules rouges de chevaux. Le tableau I donne les résultats obtenus avec les différents antigènes et avec les globules rouges de différentes espèces animales.

— Quant à l'agglutination des globules rouges par la protamine, il faut rappeler que les tableaux II, III, IV et V concernent des expériences effectuées avec une suspension à 0,5 p. 100 d'hématies de chevaux. Il est donc inutile d'y revenir. Ne possédant que très peu de référé-

rences dans la littérature sur l'action hémagglutinante de cette substance sur les globules rouges des différentes espèces animales, il a paru intéressant d'étudier cette question. Ainsi un antigène alcalin 10 p. 100 préparé à partir de cerveaux de souris et de cobayes en utilisant 8 mg de protamine par ml d'antigène montre à pH 6,4 et jusqu'à la dilution 1/256 des propriétés agglutinantes pour les globules rouges de lapin, oie, souris, poule, rat, cheval en suspension à 0,5 p. 100. Par contre, l'agglutination observée dans les mêmes conditions d'expérimentation avec des globules rouges de dix moutons différents ne se manifeste qu'avec l'antigène pur. Les différents tableaux correspondant à cette expérimentation ne seront pas reproduits. Disons seulement qu'avec des antigènes cerveau de souris et cobaye alcalin 20 p. 100 aucune agglutination n'est observée vis-à-vis des hématies de mouton lorsque la protamine est utilisée à la dose de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mg par ml d'antigène, alors qu'au même pH 6,4 l'agglutination des globules rouges des autres espèces mentionnées ci-dessus se manifeste jusqu'au 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, suivant la dose de protamine utilisée. A partir de 8 mg de protamine de ce même lot l'antigène pur est hémagglutinant pour les hématies de mouton. Avec 8, 10, 12 mg de cette même protamine par ml d'antigène l'action hémagglutinante de la protamine ne se manifeste sur les globules rouges de mouton qu'avec l'antigène pur et ceci avec l'antigène souris ou l'antigène cobaye. Avec des antigènes cobayes et souris alcalin 10 p. 100 au lieu de 20 p. 100, les résultats sont identiques pour les mêmes doses de la même protamine. Pour ces doses de 8, 10 et 12 mg de protamine, par ml d'antigène, les globules rouges des autres espèces sont agglutinés à pH 6,4 jusqu'au 1/128, 1/256 et même 1/512. La protamine a donc une action hémagglutinante très peu marquée sur les hématies de mouton. Il en est tout autrement pour les globules rouges des autres espèces animales étudiées.

— Il convient de signaler enfin que la propriété hémagglutinante de la protamine pour les globules rouges de chevaux est plus marquée lorsque les globules rouges de chevaux sont formolés (différence de deux à trois dilutions à chaque pH). Le même antigène, préparé avec

le même matériel (cerveau souris, souris, cobaye) mais sans traitement à la protamine n'agglutine pas les globules rouges formolés et ceci à tous les pH compris entre 5,75 et 7,2.

i) Influence de la lyophilisation :

Toujours dans le but d'éliminer l'agglutination non spécifique due à la protamine, on a étudié l'influence de la lyophilisation de l'antigène. Celle-ci ne supprime pas l'agglutination non spécifique observée avec des antigènes témoins traités à la protamine. Le titre agglutinant de ceux-ci n'est pas modifié.

j) Influence de la température de conservation et de la durée de conservation de l'antigène sur l'agglutination non spécifique.

On aurait pu penser qu'une maturation de l'antigène dans des conditions bien déterminées de température et de temps, compatibles avec le maintien de l'activité de l'hémagglutinine virale, serait susceptible de supprimer ou dans une certaine mesure de diminuer l'effet néfaste de la protamine. Malheureusement il n'en est rien et on a pu constater qu'après conservation à -10°C , $+4^{\circ}\text{C}$ et 27°C les antigènes témoins souris ou cobayes alcalin 10 p. 100 ou 20 p. 100 traités à la protamine, conservent du premier au quatorzième jour suivant la préparation de l'antigène la même activité hémagglutinante, avec ou sans lyophilisation. L'expérience n'a pas été poursuivie plus loin dans le temps.

k) Influence de la remise en suspension des globules rouges :

Opérant aux pH 6 et 6,4, les antigènes témoins cerveau de cobaye et souris alcalin 10 et 20 p. 100 conservés un jour à -10°C , $+4^{\circ}\text{C}$, 27°C ne voient pas leur titre hémagglutinant baisser après remise en suspension des globules rouges de chevaux à la fin de la période d'observation d'une heure ; l'expérience est répétée toutes les heures pendant dix heures consécutives.

l) Suppression de l'action hémagglutinante de la protamine par l'héparine.

L'héparine diminue l'action hémagglutinante de la protamine pour les globules rouges de chevaux et les hématies formolées de la même espèce. Il a été effectué plusieurs essais avec des antigènes témoins cerveau souris alcalin 10 et 20 p. 100 et traités à la protamine à raison

de 2, 4 et 5 mg de protamine par ml d'antigène. Il est incontestable que l'héparine jouit d'une action favorable comme en rend compte le tableau VI. Mais l'héparine utilisée est à un pH compris entre 5 et 7. Le facteur de correction à ajouter lors de l'addition d'héparine aux réactifs en présence rend cette technique trop fastidieuse pour en faire une réaction de routine.

6° Conclusions sur la réaction d'hémagglutination avec le virus de la peste équine.

Le virus de la peste équine ne possède d'action hémagglutinante qu'avec les globules rouges de cheval. L'agglutination est maximum au pH 6,4, après incubation d'une heure à 37 °C. Les antigènes servant à la réaction de l'hémagglutination et de l'inhibition de l'hémagglutination étant pour la plupart tributaires d'un traitement à la protamine, on a cherché à éliminer l'action néfaste de cette substance dans la réaction. Certains facteurs n'influencent en rien sur l'action hémagglutinante de cette substance, d'autres la diminuent. En intervenant simultanément sur différents paramètres de la réaction, on supprime facilement et totalement l'agglutination non spécifique, et on opère ainsi avec tous les critères de sécurité voulus. Il faudra donc travailler à pH 6,4, avec un diluant albumine à 0,4 p. 100, utiliser des souriceaux nouveaux comme source d'antigène, et une protamine très purifiée. Le plus grand soin sera apporté au choix de celle-ci. Si elle n'est pas suffisamment pure, son activité hémagglutinante sera titrée et un facteur de correction apporté à la lecture du test d'agglutination. Dans la pratique courante du titrage d'un antigène de la peste équine traité à la protamine, il doit être exigé de faire la même réaction avec un antigène témoin préparé strictement dans les mêmes conditions. L'antigène témoin doit être négatif. C'est toujours le cas lorsque l'on respecte les conditions posées ci-dessus : pH 6,4, diluant albumine à 0,4 p. 100, souriceau nouveau-né, protamine de bonne qualité. On pourrait éventuellement accepter une différence de quatre ou cinq dilutions entre le titre hémagglutinant de l'antigène témoin et de l'antigène peste équine après traitement à la protamine, mais cette tolérance aura surtout toute sa valeur de sécurité dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

II. — Réaction d'inhibition de l'hémagglutination

1° Expérience fondamentale. Effet du sérum de cheval.

Il a été constaté que dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination le sérum de cheval diminue considérablement les propriétés hémagglutinantes de la protamine, vis-à-vis des globules rouges de cheval (tableau VII).

Ce phénomène est constant, il s'observe avec tous les sérums de chevaux. Ainsi s'efface avec la réaction d'inhibition de l'hémagglutination les dernières difficultés dues au pouvoir hémagglutinant de la protamine. Si une protamine peut dans certains cas gêner ou empêcher la réaction d'hémagglutination, la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, elle, est possible avec une telle protamine. L'influence du sérum de cheval tient *proparte* à la présence d'albumines dans celui-ci mais vraisemblablement aussi à un autre facteur puisqu'il a été montré précédemment que la quantité d'albumine ne semble pas avoir d'influence sur l'activité hémagglutinante de la protamine.

2° Influence du tampon de dilution.

Les remarques qui ont été formulées à propos du rôle du tampon dans la réaction d'agglutination directe sont également valables ici comme le montre le tableau VIII. Dans la réaction directe comme dans la réaction d'inhibition, on utilisera donc le tampon albumine à 0,4 p. 100 de préférence au tampon phosphate pH 9. Le rôle favorable du diluant albumine est discret dans la réaction d'inhibition, masqué qu'il est par le rôle encore plus favorable du sérum, ce qui n'est pas le cas dans la réaction directe effectuée en l'absence de sérum.

3° Influence du kaolin.

Le kaolin est utilisé pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination. Il est utilisé à Farcha de préférence à l'acétone parce que le traitement au kaolin est plus rapide et moins onéreux et qu'il donne d'aussi bons résultats. Certains laboratoires traitent le sérum avec des suspensions de kaolin à 25 p. 100, d'autres avec des suspensions de kaolin à

TABLEAU N°VII

Effet favorable de sérum de cheval sur l'action hémagglutinante de la protamine

Antigène cerveau souris traité à la protamine (3mg/ml d'antigène)	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Agglutination directe	+	+	+	+	+	+	-
Inhibition de l'hémagglutination (avec sérum de cheval)	+	-	-	-	-	-	-

TABLEAU N°VIII

Influence de la nature du tampon de dilution de l'antigène sur la propriété hémagglutinante de la protamine dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

Antigène cerveau souris Alcalin 20 p.100 Traité à la protamine Diluant albumine à 0,4p.100	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Témoin GR
4 mg protamine/ml d'antigène { a b	+ +	+ +	+ +	+ ±	- -	- -	- -	- -
6 mg protamine/ml d'antigène { a b	+ +	+ +	+ +	+ +	+ -	- -	- -	- -
10 mg protamine/ml d'antigène { a b	+ +	+ +	+ +	+ +	+ -	+ -	- -	- -
12 mg protamine/ml d'antigène { a b	+ +	+ +	+ +	+ +	+ ±	+ -	- -	- -

a = diluant tampon phosphate pH9 ; b = diluant albumine à 0,4p.100.

TABLEAU N°IX

Influence de l'incubation du système antigène-sérum sur l'hémagglutination due à la protamine dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

Antigène cerveau souris Alcalin 20 p.100 traité à la protamine (diluant : tampon pH 9)	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Témoin G.R.	Témoin sérum
6mg protamine/ml d'antigène { a b	+ +	+ -	+ -	- -	- -	- -	- -	- -
8mg protamine/ml d'antigène { a b	+ +	+ ±	+ -	- -	- -	- -	- -	- -
10mg protamine/ml d'antigène { a b	+ +	+ +	+ +	+ ±	+ -	+ -	- -	- -
12mg protamine/ml d'antigène { a b	+ +	+ +	+ +	+ +	+ ±	+ -	- -	- -

(a = incubation d'une heure à température ambiante (27° C); (b = incubation de vingt heures au frigidaire, à + 4° C.

15 p. 100. Il a été réalisé pour cette étude des réactions d'inhibition de l'hémagglutination avec des antigènes protaminés et des sérums traités au kaolin à 15 p. 100, à 20 p. 100, à 25 p. 100. Aucune différence ne se manifestant dans les résultats nous avons adopté, de façon définitive, la suspension à 25 p. 100 de *kaolin lavé aux acides*.

4° Influence de l'incubation du système antigène sérum sur l'hémagglutination due à la protamine.

Nous avons vu à propos de l'hémagglutination directe qu'après une heure d'incubation à 4 °C l'agglutination due à la protamine était légèrement inférieure à celle observée avec les mêmes réactifs après incubation pendant le même temps à 37 °C ou à 27 °C. La remarque est également valable dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination. Après une incubation de 18-20 heures à 4 °C avant addition des globules rouges, l'inhibition de l'action hémagglutinante de la protamine est plus complète comme le montre le tableau IX où la réaction est effectuée en utilisant comme précédemment du sérum de cheval de France traité au kaolin.

5° Conclusions sur la réaction d'inhibition de l'hémagglutination :

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination dans la peste équine se fera donc à pH 6,4 en diluant albumine à 0,4 p. 100, en utilisant un antigène préparé avec des encéphales de souriceaux nouveau-nés et une protamine de bonne qualité. Le sérum sera traité au kaolin et l'incubation du système sérum-antigène (4 à 8 unités) sera faite à 4 °C pendant dix à vingt heures.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° Les réactions d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination avec le virus de la

peste équine ne posent pas de difficultés lorsque la protamine utilisée pour la préparation des antigènes est de bonne qualité et sous réserve de travailler dans les conditions suivantes :

- pH 6,4,
- diluant albumine à 0,4 p. 100,
- encéphale de souriceau nouveau-né comme source d'antigène,
- incubation de 10 à 20 heures à 4 °C dans le test d'inhibition.

Dans ces conditions, l'hémagglutination non spécifique est supprimée.

2° La réaction d'hémagglutination directe avec le virus de la peste équine est délicate lorsque la protamine utilisée est de qualité moyenne et que le type de virus utilisé a un faible taux hémagglutinant (type 5 par exemple). Avec un tel type de virus et une protamine de mauvaise qualité, la lecture du test comparée à celle de l'antigène témoin ne présente pas une marge de sécurité suffisamment grande pour que ce test soit recommandé.

En tout état de cause, il paraît que l'on devrait s'abstenir d'utiliser le test d'hémagglutination pour définir le type sérologique d'un virus de la peste équine.

3° La réaction d'inhibition de l'hémagglutination par contre est toujours possible même avec une protamine de qualité médiocre.

4° Dans tous les cas, les réactions seront effectuées avec un antigène témoin préparé dans les mêmes conditions que l'antigène hémagglutinant.

*Institut d'élevage et de Médecine
Vétérinaire des Pays Tropicaux.
Laboratoire de Recherches Vétérinaires
de Farcha, Fort-Lamy, Tchad.*

SUMMARY

Hemagglutination and Hemagglutination inhibition tests with horse sickness virus. Limits of their interpretation

The role played by the various factors in the H. T. and H. I. T. with horse sickness virus i. e. antigen, red cells, pH, protamine, buffer has been studied. The authors came to the conclusion that some requirements have to be met in order to ascertain the full value of both tests.

RESUMEN

Las reacciones de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación con el virus de la peste equina. Límites de su interpretación

Se mostró la influencia de varios factores que desempeñan un papel en las reacciones de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación con el virus de la peste equina : antígeno, glóbulos rojos, pH, protamina, tampón. Al fin, los autores notaron que se necesita un cierto número de condiciones para asegurar la valor total de dichas reacciones.

BIBLIOGRAPHIE

1. CLARKE (D. H.) et CASALS (J.). — **Techniques pour l'hémagglutination et l'inhibition de l'hémagglutination avec les arbovirus.** *Amer. J. Trop. Med.*, 1958, 7 : 651.
2. DELPY (J.). — **Préparation d'un antigène purifié (protamine-éther) pour la sérologie des affections du groupe Coxsackie.** *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 84 : 780-782.
3. PAVRI (K. M.). — **Hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination avec le virus de la peste équine africaine.** *Nature*, 1961, 189 : 249.
4. PAVRI (K. M.) et ANDERSON (C. R.). — **Réaction d'inhibition de l'hémagglutination avec différents types de virus de la peste équine africaine.** *Ind. J. Vet. Sci.*, 1963, 33 : 113-117.
5. PORTEFIELD (J. S.) et ROWE (G. B.). — **Hémagglutination des arbovirus. Inhibition de l'hémagglutination par certains phospholipides.** *Virology*, 1960, 11 : 765-770.