

TRAVAUX ORIGINAUX

Application de la méthode de séro-neutralisation cinétique à la recherche des anticorps neutralisant le virus de la peste bovine chez les bovins les caprins et les ovins *

par P. BOURDIN et G. BERNARD

RÉSUMÉ

La méthode cinétique de séro-neutralisation mise au point par LEPINE, ROGER et ROGER (1959) peut être adaptée avec quelques modifications à la recherche des anticorps bovipestiques chez les bovins, les ovins et les caprins. Elle a révélé, au Sénégal, que 48 p. 100 des caprins et 62,7 p. 100 des ovins vivant en zone d'endémie étaient porteurs d'anticorps neutralisants, ce chiffre descendant à 28 p. 100 pour les caprins vivant en zone indemne. La responsabilité de la présence de ces anticorps en zone indemne peut être attribuée au virus PPR.

La technique de séro-neutralisation sur cultures cellulaires décrites par PLOWRIGHT et FERRIS (1961) a l'avantage d'être une méthode sûre et efficace. Elle a permis de contrôler au Nigeria les résultats de la vaccination des bovins lors de la campagne conjointe (rapport du Département Fédéral de Recherches Vétérinaires VOM, 1964) et de rechercher la présence d'anticorps neutralisant le virus de la peste bovine chez les caprins et les ovins ; ZWART et ROWE (1966). Cependant, elle a l'inconvénient d'être d'un débit relativement faible. Pour remédier à ce défaut, il a été envisagé d'adapter la méthode cinétique de séro-neutralisation mise au point par LEPINE, ROGER et ROGER (1959) à la

recherche des anticorps neutralisant le virus bovipestique chez les bovins, les caprins et les ovins.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

A) Les réactifs.

a) Milieux.

Le milieu de Earle décrit par JOHNSON (1962), contenant une forte concentration de glucose et une faible concentration d'hydrolysate de lactalbumine, a été utilisé. Cependant, pour éviter les changements de milieux trop fréquents, la quantité de bicarbonate de sodium qui est de 0,75 g p. 1.000 dans le milieu de JOHNSON, a été portée à 1,5 g p. 1.000.

* Communication présentée au 18^e congrès mondial vétérinaire. Paris, 17-22 juillet 1967.

Ce milieu contient, en outre, des acides aminés et des vitamines dans les proportions suivantes :

L Glutamine	0,1	g p. 1.000
L acide glutamique	0,1	g —
L méthionine	0,15	g —
L chlorhydrate d'arginine	0,04	g —
Biotine	0,001	g —
Acide folique	0,001	g —

b) Tampon.

Le tampon tris utilisé dans la technique de LEPINE, ROGER et ROGER (1959) retarde l'apparition de l'effet cytopathogène ; le tampon bicarbonate n'a pas cet inconvénient. La quantité de 1,5 g p. 1.000 de bicarbonate de soude présente dans le milieu est complétée par 1,5 ml p. 100 d'une solution de bicarbonate de soude à 55 p. 1.000 et 0,5 ml p. 100 de soude N/10. Les cellules supportent bien le pH élevé qui en résulte.

c) Sérum.

Contrairement à la technique décrite par LEPINE, ROGER et ROGER, le milieu ne contient pas de sérum en dehors du sérum examiné dont la concentration finale ne doit pas dépasser 5 p. 100 pour éviter un retard dans l'apparition de l'effet cytopathogène.

d) Souche cellulaire.

La souche MDBKC, isolée par MADIN et DARBY (1958), convient parfaitement pour la séro-neutralisation cinétique. Elle tire son origine d'un rein de bovin adulte et en est actuellement à son 315^e passage. Elle est cultivée dans le milieu décrit précédemment (paragraphe a) contenant 1,5 g de bicarbonate p. 1.000 et 10 p. 100 de sérum de veau. Après 8 jours de culture, les cellules sont détachées à l'aide d'un mélange de versène mis en solution dans du PBS sans calcium ni magnésium et de trypsine dissoute en tampon tris, dont voici les formules :

Trypsine en tris :

Chlorure de sodium	8	g
Chlorure de potassium	0,38	g
Phosphate disodique	0,1	g
Dextrose	1	g
Tris	3	g
Rouge de phénol	0,015	g
Eau distillée	1.000	ml

Ajuster à pH 7,4 avec ClH N/1

Trypsine 1/250	2,5	g
Pénicilline	100.000	U
Streptomycine	0,1	g

Filtrer sur Seitz EKS et conserver à 4 °C.

* Solution de versène :

Chlorure de sodium	8	g
Chlorure de potassium	0,2	g
Phosphate disodique	1,15	g
Phosphate monopotassique	0,2	g
E. D. T. A. sodique	0,2	g
Eau bidistillée	1.000	ml
Rouge de phénol	0,015	g

Autoclaver 20 minutes à 120 °C, conserver à + 4 °C.

Au moment de l'emploi, quatre parties de versène sont mélangées à une partie de trypsine. Pour détacher les cellules, on procède à trois lavages successifs avec environ 10 ml du mélange pour une boîte de Roux, le dernier lavage étant laissé 5 à 10 minutes à l'étuve à 37 °C. Quand les cellules sont complètement détachées, on procède à la récolte et à la numération puis à la répartition à la concentration voulue.

e) Virus.

Le virus utilisé est la souche RP KO/BK (99 passages) de PLOWRIGHT et FERRIS (1962) provenant de la souche africaine Kabete 0 atténuée par passages sur cellules rénales d'embryon de veau. Ce virus inoculé sur cellules MDBKC détruit le tapis cellulaire en 5 à 6 jours. Quand le tapis est atteint à 80 p. 100, la suspension virulente est récoltée, distribuée en flacons de 5 ml et conservée à — 30 °C.

f) Sérum à titrer.

Les sérums sont recueillis stérilement, centrifugés, inactivés 30 minutes à 56 °C et conservés à — 20 °C en attendant leur emploi.

B) Titrage du virus.

Pour tenir compte des indications de LEPINE, ROGER et ROGER (1959), il convient de rechercher la plus petite quantité de virus capable de produire une destruction homogène dans le même temps et dans tous les tubes considérés. Cette destruction cesse d'être homogène avec les cellules MDBKC à partir du 6^e jour. Le

problème revient à chercher la plus petite DL 100.

Le virus est dilué de 0,5 en 0,5 logarithme dans le milieu contenant du bicarbonate de sodium et de la soude N/10 aux concentrations indiquées. Chaque dilution est répartie dans 10 tubes à hémolyse à raison de 0,5 ml par tube, puis pour se placer dans les conditions mêmes de la réaction comme l'ont fait ZWART et ROWE (1966) il convient d'ajouter dans tous les tubes 0,05 ml de sérum de bovin ou de caprin, inactivé et dépourvu d'anticorps pestiques. Cette répartition se fait avec une pipette compte-gouttes. Après agitation énergique, les tubes sont placés à 37 °C pendant une heure. Puis une suspension de cellules MDBKC à 100.000 unités par ml, réalisée dans un milieu identique dépourvu de sérum est introduite dans tous les tubes à raison de 0,5 ml par tube. Après agitation, il est distribué dans tous les tubes 0,5 ml d'huile de vaseline stérilisée à 105 °C. Finalement, l'ensemble est mis à l'étuve à 37 °C.

L'expérience a montré que le titrage devait s'effectuer en présence d'un sérum provenant de la même espèce animale que celui examiné lors de la réaction, car la DL 100 varie suivant l'origine du sérum.

C) La réaction de séro-neutralisation.

L'examen de chaque sérum nécessite 5 tubes, 4 pour la réaction et un témoin sérum dans lequel le virus est remplacé par une quantité identique de milieu tamponné.

Le virus est dilué, à la concentration indiquée par le titrage, dans le milieu tamponné. Cette solution est répartie à la quantité de 0,5 ml dans tous les tubes sauf les témoins. Puis 0,05 ml de sérum à examiner sont ajoutés dans chacun des 5 tubes, le sérum se trouvant ainsi dilué au 1/10. Après agitation, les tubes sont placés à l'étuve à 37 °C pendant une heure.

Passé ce délai, chaque tube reçoit 0,5 ml de suspension cellulaire à 100.000 unités par ml distribuées en milieu tamponné. On recouvre la surface libre d'huile de vaseline, à raison de 0,5 ml par tube. L'ensemble est ensuite placé à l'étuve à 37 °C jusqu'au moment de la lecture.

Il est nécessaire de réaliser un témoin virus sur 5 tubes, recevant chacun 0,5 ml de suspension virulente, 0,05 ml de sérum dépourvu d'anti-

corps (provenant de la même espèce que le sérum soumis à l'examen) 0,5 ml de suspension cellulaire et 0,5 ml d'huile de vaseline.

Dès le troisième ou quatrième jour, les cellules se sont multipliées au fond du tube où elles forment un tapis complet aussi bien dans les tubes témoins que dans les tubes de la réaction. Les tubes sont examinés au microscope inversé les 5^e et 6^e jours. A cette date, l'effet cytopathogène doit être complet dans tous les témoins virus. Dans les tubes utilisés pour la réaction, différentes lésions peuvent être distinguées au moment de la lecture :

1^o Le tapis cellulaire n'est pas modifié : le virus a été neutralisé par le sérum qui contient des anticorps à la dilution de 1/10.

2^o Le tapis cellulaire est complètement détruit ou présente plusieurs plages bordées de cellules arrondies, le témoin sérum ne présentant pas de lésions : le sérum ne contient pas d'anticorps pouvant neutraliser le virus à la dilution au 1/10.

3^o La réaction est douteuse, lorsque dans les tubes, on observe la présence d'amas de cellules arrondies sans plage, ou bien lorsque 2 tubes sur 4 présentent des lésions nettes.

II. — LES RÉSULTATS

La technique cinétique a été appliquée conjointement avec la méthode de PLOWRIGHT et FERRIS (1961) pour un certain nombre d'examins.

A) Recherche d'anticorps neutralisants chez les bovins.

Les sérums au nombre de 51 provenaient d'animaux achetés au Maroc et au Sénégal oriental, reconnus indemnes de peste bovine. L'examen des sérums dilués au 1/10 donne le même résultat : tous les sérums sont dépourvus d'anticorps, avec les deux méthodes.

B) Recherche d'anticorps neutralisants chez les caprins et les ovins âgés de 6 mois à 4 ans, d'origine sénégalaise.

1^o Caprins vivants en zone d'endémie.

305 sérums examinés par les deux méthodes après dilution au 1/10 ont permis d'enregistrer les résultats suivants :

a) *Méthode classique.*

Animaux dépourvus d'anticorps ..	35,4 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	41,7 p. 100
Animaux douteux	22,9 p. 100

b) *Méthode cinétique.*

Animaux dépourvus d'anticorps ..	31,2 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	48,8 p. 100
Animaux douteux	20,0 p. 100

c) *Comparaison des deux méthodes.*

L'analyse des résultats obtenus montre qu'ils sont identiques dans 85,3 p. 100 des cas, répartis comme suit :

Animaux dépourvus d'anticorps ..	31,2 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	39,7 p. 100
Animaux douteux	14,4 p. 100

Les résultats différents, dont le pourcentage est de 14,7 se répartissent de la manière ci-après.

	Méthode cinétique	Méthode classique
7,9 p. 100	neutralisants	douteux
1,3 p. 100	neutralisants	pas d'anticorps
2,9 p. 100	douteux	pas d'anticorps
2,6 p. 100	douteux	neutralisants

2^o Ovins vivant en zone d'endémie.

L'examen de 244 sérums après dilutions au 1/10, provenant d'ovins âgés de 1 à 5 ans, testés par les deux méthodes, a permis d'enregistrer les résultats suivants :

a) *Méthode classique.*

Animaux dépourvus d'anticorps ..	31,2 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	50,5 p. 100
Animaux douteux	18,3 p. 100

b) *Méthode cinétique.*

Animaux dépourvus d'anticorps ..	25 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	62,7 p. 100
Animaux douteux	12,3 p. 100

c) *Comparaison des deux méthodes.*

L'analyse des résultats obtenus montre qu'ils sont identiques dans 83,4 p. 100 des examens, répartis comme suit :

Animaux dépourvus d'anticorps ..	25 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	48,5 p. 100
Animaux douteux	9,9 p. 100

Les résultats différents, dont le pourcentage est de 17,6 p. 100, se répartissent de la manière suivante :

	Méthode cinétique	Méthode classique
9,4 p. 100	neutralisants	douteux
4,8 p. 100	neutralisants	pas d'anticorps
1,4 p. 100	douteux	pas d'anticorps
2 p. 100	douteux	neutralisants

3^o Caprins vivant en zone indemne :

L'examen de 231 sérums, dilués au 1/10, provenant de caprins âgés de 1 à 5 ans, testés par les deux méthodes, a permis de noter les résultats suivants :

a) *Méthode classique.*

Animaux dépourvus d'anticorps ..	60,6 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	19 p. 100
Animaux douteux	20,4 p. 100

b) *Méthode cinétique.*

Animaux dépourvus d'anticorps ..	54,1 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	28,6 p. 100
Animaux douteux	17,3 p. 100

c) *Comparaison des deux méthodes.*

L'analyse des résultats montre qu'ils sont identiques dans 81,4 p. 100 des examens, répartis comme suit :

Animaux dépourvus d'anticorps ..	54,2 p. 100
Animaux pourvus d'anticorps	15,2 p. 100
Animaux douteux	12 p. 100

Les résultats différents, dont le pourcentage atteint 18,6 p. 100, se répartissent de la manière suivante :

	Méthode cinétique	Méthode classique
7,8 p. 100	neutralisants	douteux
6 p. 100	neutralisants	pas d'anticorps
0,9 p. 100	douteux	pas d'anticorps
3,9 p. 100	douteux	neutralisants

III. — DISCUSSION

Elle portera sur deux points, la valeur de la méthode cinétique et la présence d'anticorps chez les petits ruminants.

A) La méthode cinétique.

L'analyse des résultats obtenus par les 2 méthodes montre que ceux-ci diffèrent dans des pro-

portions variant entre 14 et 18 p. 100. L'examen du tableau comparatif révèle que :

a) 7,9 à 9,4 p. 100 des sérums positifs avec la méthode cinétique sont douteux avec la technique classique.

0,9 à 2,9 p. 100 des sérums douteux avec la méthode cinétique sont négatifs avec la technique classique. Ce fait traduit un défaut de sensibilité de la méthode cinétique dans environ 11 p. 100 des examens.

b) 1,3 à 6 p. 100 des sérums positifs avec la méthode cinétique sont négatifs avec la méthode classique, ce qui traduit un manque de sensibilité totale.

c) 2 à 3,9 p. 100 des sérums douteux avec la méthode cinétique sont positifs avec la technique classique, ce qui traduit un certain pourcentage de résultats abhérents.

En conclusion, la méthode cinétique employée conjointement avec la technique classique donne des résultats similaires dans 85,3 à 81,4 p. 100 des examens. Les résultats différents sont en majorité dus au manque de sensibilité de cette méthode. Néanmoins, elle a l'avantage d'être d'un plus grand débit, mais son emploi en raison de son léger manque de sensibilité doit être réservé aux enquêtes épidémiologiques, les examens individuels devant se faire par la technique classique.

B) La présence d'anticorps neutralisants chez les petits ruminants.

a) *En zone d'endémie.*

41,7 p. 100 des caprins d'après la technique classique et 48,8 p. 100 d'après la méthode cinétique hébergent des anticorps dans leur sérum.

50,5 p. 100 des ovins d'après la technique classique et 62,7 p. 100 d'après la méthode cinétique ont des anticorps dans leur sérum.

b) *En zone indemne.*

15,2 p. 100 des caprins d'après la technique classique et 28,6 p. 100 d'après la méthode cinétique hébergent des anticorps dans leur sérum.

ZWART et ROWE (1966) signalent au Nigeria, la présence d'anticorps à un taux moyen de 15,2 p. 100 chez les caprins et de 18,8 p. 100 chez les ovins vivants en zone d'endémie. Les pourcentages sont beaucoup plus élevés au Sénégal. Ces mêmes auteurs rapportent que dans une région indemne, il n'y a pour ainsi dire pas d'anticorps chez les ovins.

Au Sénégal, les résultats sont différents. En effet, en zone indemne le taux de caprins hébergeant des anticorps varie entre 15,2 et 18,6 p. 100 selon la technique utilisée. Quelle est l'origine de ces anticorps ? Si, en zone d'endémie, on peut suspecter la transmission du virus bovine pestique par contact aux petits ruminants, comme l'ont montré ZWART et MACADAM (1967), cette transmission ne peut être retenue en zone indemne. Dans ce cas, on peut suspecter l'existence d'un virus de faible virulence, adapté aux petits ruminants, qui se transmettrait d'un animal à l'autre. On peut penser qu'il s'agit du virus PPR décrit par MORNET et collab. (1956). Il serait un mutant du virus pestique transmissible de caprins à caprins mais incapable de passer des caprins aux bovins comme l'ont montré GILBERT et MONNIER (1962).

Des travaux en cours au laboratoire de Dakar tendent à montrer que les virus bovine pestique et PPR, s'ils sont identiques du point de vue immunologique, diffèrent néanmoins par certaines de leurs propriétés biologiques et ainsi serait confirmé le qualificatif de mutant appliqué au virus PPR.

*Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire
des Pays tropicaux Maisons-Alfort
Laboratoire National de l'Elevage
et de Recherches Vétérinaires Dakar-Hann*

SUMMARY

Application of the Kinetic Seroneutralization test to the research of Rinderpest neutralizing antibodies in cattle sheep and goat

The kinetic Sero-neutralization method, developed by LEPINE, ROGER et ROGER (1959), has been adapted with some slight alteration to the research of Rinderpest antibodies in cattle sheep and goat. In Senegal, these neutralizing

antibodies have been evidenced in 48 p. 100 of the goats and 62,7 p. 100 of the sheeps living in enzootic area ; in the areas free of Rinderpest the percentage of the goats showing these neutralizing antibodies was only 28 p. 100. The cause of the presence of these antibodies in free disease area has been assumed to be the SPR (Small Ruminant Rinderpest) virus.

RESUMEN

Aplicación del método cinético de sero-neutralización para la búsqueda de los anticuerpos neutralizando el virus de la peste bovina en los bovinos, los caprinos y los ovinos

Se puede adaptar el método cinético de sero-neutralización mejorada por LEPINE, ROGER y ROGER (1969) con algunas modificaciones para la búsqueda de los anticuerpos bovipesticos en los bovinos, los ovinos y los caprinos. En Senegal, mediante el dicho método se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes en 48 p. 100 de los caprinos y 62,7 p. 100 de los ovinos viviendo en zona de epidemia, mientras el porcentaje solo llegaba a 28 p. 100 en lo concerniente los caprinos viviendo en una zona indemne de peste bovina. El virus PPR (Peste de los pequeños rumiantes) sería causa de la presencia de estos anticuerpos en la zona indemne.

BIBLIOGRAPHIE

- Federal department of Veterinary Research V. O. M., Joint Project 15, Rinderpest Eradication Campaign Phase I. Report on the production and distribution of rinderpest vaccines and associated research, 1964, 1-22.
- GILBERT (Y.) et MONNIER (J.). — **Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1962, **XV**, 321-335.
- JOHNSON (R. H.). — **Rinderpest in tissue culture I. — Methods for virus production.** *Brit. Vet. J.*, 1962, **118**, 107-116.
- LÉPINE (P.), ROGER (F.) et ROGER (A.). — **La réaction cinétique de séroneutralisation des virus poliomyélitiques.** *Bull. O. M. S.*, 1959, **20**, 563-578.
- MADIN (S. H.) et DARBY (N. B.). — **Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin.** *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1958, **98**, 574-576.
- MORNET (P.), ORUE (J.), GILBERT (Y.), 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**, 313-343.
- PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — **Studies with rinderpest virus in tissue culture. III. — The stability of cultured virus and its use in virus neutralisation tests.** *Arch. ges. Virusforsch.*, 1961, **2**, 516-533.
- PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — **Studies with rinderpest virus in tissue culture. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle.** *Res. vet. Sci.*, 1962, **8**, 172-182.
- ZWART (D.) et ROWE (L. W.). — **The occurrence of rinderpest antibodies in the sera of sheep and goats in northern Nigeria.** *Res. vet. Sci.*, 1966, **7**, 504-511.
- ZWART (D.) et MACADAM (I.). — **Transmission of rinderpest by contact from cattle to sheep and goats.** *Res. vet. Sci.*, 1967, **8**, 37-47.