

Possibilités et limites de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination morbillieuse dans la sérologie de la Peste bovine (test IHM)

III. — Utilisation du papier buvard dans la sérologie de la peste bovine mettant en jeu le test IHM

par Y. MAURICE et A. PROVOST

(I. E. M. V. T., Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, Fort-Lamy, Tchad)

RÉSUMÉ

L'absorption des sérums à éprouver sur une bande de papier buvard permet de surmonter la difficulté de l'envoi des échantillons au laboratoire en vue du diagnostic sérologique de peste bovine. Une quantité donnée de sérum est absorbée sur une surface déterminée de papier buvard. L'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination morbillieuse (test IHM) se fait au laboratoire en reconstituant le sérum à éprouver.

INTRODUCTION

Les méthodes de base du diagnostic de la peste bovine au Tchad sont la précipitation diffusion en gélose à partir du ganglion suspect en présence d'un sérum hyperimmun précipitant de référence, l'isolement du virus sur cellules de reins d'embryon de veau et son identification, et l'inhibition de l'hémagglutination morbillieuse, à partir du sérum suspect, qui vise à mettre en évidence l'apparition d'anticorps ou une montée du taux de ceux-ci. En présence de souches hypovirulentes qui ne tuent que peu ou pas de bovins, cette dernière technique se montre très utile. C'est celle-ci que l'on a utilisée depuis trois années parce que, il faut bien le dire aussi, le sérum est souvent le seul prélèvement reçu au laboratoire pour établir les diagnostics de peste bovine.

L'envoi rapide au laboratoire des échantillons de sérums recueillis sur le terrain afin de diagnostiquer la peste bovine, constitue d'une

façon générale un sérieux problème dans de nombreux pays par suite des difficultés de transport et de la nécessité du maintien sous froid des sérums. Il arrive en effet souvent, surtout en saison chaude, que les échantillons soient altérés au cours du voyage, ce qui nuit à la spécificité de la réaction au laboratoire. Une méthode par laquelle les sérums à éprouver sont absorbés sur papier buvard, a été étudiée et mise au point pour surmonter ces difficultés. L'absorption des sérums sur papier buvard ou papier filtre a déjà suscité un certain nombre de travaux : elle a été utilisée par ADAMS et HANSON (1) pour la stomatite vésiculeuse, KARSTAD et coll. (9) pour l'encéphalite équine de l'Est, GREEN et OPTOM (8) pour la polyomyélite, WORTH (14) pour les oreillons, BENDSON et MICKLE (3) pour la maladie de Carré, BRODY et coll. (6) pour les adénovirus et la rougeole, GAGGERO (7) pour la fièvre aphteuse.

Il était intéressant, dans un pays où les trans-

ports sous glace posent un problème sérieux, d'étudier la possibilité d'utiliser le sérum desséché sur papier buvard pour le diagnostic de peste bovine mettant en jeu le test IHM.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

— Sérums.

Les échantillons de sérum et de sang proviennent de bovins vaccinés contre la peste bovine et abattus à l'abattoir de Farcha et d'animaux d'expérience. Les échantillons de sérum utilisés proviennent également des envois adressés au laboratoire de Farcha ces deux dernières années en vue d'établir un diagnostic de peste bovine. Les sérums contrôlés sont les sérums correspondant à ceux absorbés sur papier buvard et conservés à -15°C .

— Papier buvard.

Le papier buvard est celui vendu couramment dans le commerce à Fort-Lamy (papier buvard pesant 1,35 g par dm^2 , de couleur blanche). Ces papiers buvards ne sont pas stérilisés et aucune précaution particulière n'est prise pour éviter les contaminations. Seul le papier buvard a été utilisé parce qu'un certain nombre d'auteurs, VAISMAN et coll. (13) et OPPELAR (12) en particulier ont obtenu des résultats meilleurs qu'avec les papiers filtres.

— Manipulations sur le sang.

Chaque échantillon de sang est absorbé par une surface déterminée de papier buvard. Il est identifié au moyen d'un numéro inscrit avec un crayon noir ordinaire à l'envers du papier comportant également la date de prélèvement du sang. Le papier buvard utilisé retient 7 ml de sang sur une surface de 6×20 cm. Après imprégnation par le sang, les bandes sont mises à sécher, suspendues par une extrémité, une demi-heure à 1 heure à température ordinaire, puis conservées sous enveloppe. Avant utilisation, chaque bande est divisée en 2 et l'on place une de ces moitiés dans un tube de 22 mm de diamètre stérile où sera faite la reconstitution.

Pour chaque demi-bande de papier on ajoute dans le tube 7 ml de tampon de Cohen de façon à avoir une reconstitution à la dilution de 1/2 de volume initial de sang absorbé. L'ensemble buvard-tampon est placé à 4°C pendant une

nuit ou simplement une heure à la température ordinaire (les résultats sont identiques).

— Manipulations sur le sérum.

Chaque échantillon de sérum est absorbé sous le volume de 1 ml sur une bande de papier buvard de $4 \text{ cm} \times 12,5 \text{ cm}$. Chaque échantillon est identifié comme précédemment. Après imprégnation par le sérum, les bandes sont mises à sécher 1/2 heure à 1 heure à température ordinaire puis conservées sous enveloppe, pendant des temps variables, à la température ordinaire, à 4°C et à -15°C . Certains échantillons sont laissés au contact de l'air et de la lumière. Avant utilisation, chaque bande est placée dans un tube de 22 mm de diamètre, stérile, et on reconstitue avec 2 ml de tampon de Cohen pour avoir une dilution au 1/2. Après un contact de 1 heure à température ordinaire ou de une nuit à 4°C , le papier buvard est pressé contre le fond du tube avec 1 baguette de verre et l'on obtient 0,6 ml de sérum reconstitué au 1/2, quantité suffisante pour effectuer le test IHM. Il n'a pas été jugé utile de recourir à l'extraction du sérum par la méthode d'ANDERSON et coll. (2) ou de OPPELAR (11), l'extraction simple donnant satisfaction.

— La réaction.

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse est effectuée à partir des sangs ou des sérums reconstitués en utilisant la même technique que celle mise en œuvre pour la réaction d'inhibition de l'hémagglutination à partir du sérum lui-même (4, 5). Les limites d'interprétation de la réaction, ses limites d'emploi, sont également celles énumérées dans les articles précédents (10) lorsque l'on utilise le sérum lui-même.

RÉSULTATS

Les résultats mentionnés ci-dessous concernent des réactions où les sérums absorbés et les sérums témoins ont été testés avec le même lot d'antigène et d'hématies de patas, dans les mêmes conditions expérimentales.

1^o A partir du sang :

a) Sang de bovins vaccinés avec un vaccin antipestique de culture cellulaire ou un vaccin

caprinisé. Les animaux ont été vaccinés une ou plusieurs fois.

Le détail des résultats est le suivant :

— Nombre de sérums positifs au test IHM : 25 sur 86.

— Nombre de sangs reconstitués 8 jours après absorption et positifs au test IHM : 14 sur 86 (*).

— Nombre de réactions illisibles à partir du sang : 22 sur 86.

Conclusion : il n'est pas possible d'utiliser le sang récolté directement sur papier buvard dans la sérologie de la peste bovine mettant en jeu la réaction d'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse en raison :

— Du nombre élevé de réactions illisibles et de réactions difficilement lisibles aux dilutions 1/2 et 1/4 (hémolyse des globules rouges absorbés sur le papier buvard qui rend le liquide de reconstitution rouge sombre).

— De la coagulation fréquente du liquide de reconstitution quand celui-ci est inactivé à 56 °C.

— Des résultats peu fidèles obtenus.

2° A partir du sérum :

a) Comportement des sérums absorbés sur papier buvard et conservés à température ordinaire et à la lumière, à température ordinaire et à l'abri de la lumière, à 4 °C à l'abri de la lumière.

— 33 sérums envoyés au laboratoire pour diagnostic de peste bovine ont été mis sur papier buvard en quatre exemplaires.

● 1 lot a été conservé à température ordinaire, à la lumière,

● 2 lots ont été conservés à température ordinaire, à l'abri de la lumière,

● 1 lot a été conservé à 4 °C.

La réaction IHM est effectuée 60 jours plus tard en utilisant les sérums reconstitués extemporanément et le sérum contrôle correspondant. Les résultats sont mentionnés dans le tableau I.

La même opération a été effectuée sur 28 sérums envoyés au laboratoire pour diagnostic de peste bovine. La réaction IHM a été effectuée 2 mois et demi après l'absorption.

(*) Les sérums correspondants à 2 de ces sangs sont négatifs au test IHM

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau II.

Les 61 sérums précédents placés sur papier buvard et conservés à température ordinaire sous enveloppe ont également été testés 15 jours après l'absorption. Les taux d'anticorps IHM sont identiques à ceux des témoins.

Conclusion : après un délai de 60 jours, les anticorps IHM sont rendus inactifs à température ordinaire et à la lumière ; ils sont également inactivés pour la plupart à l'abri de la lumière et à température ordinaire. Ils persistent à un taux identique après un séjour de 15 jours à température ordinaire, sous enveloppe, à l'obscurité et après 2 mois et demi de séjour à 4 °C, sous enveloppe.

b) Comportement des sérums absorbés sur papier buvard et conservés à 4 °C, à l'abri de la lumière.

α) Sérums d'animaux malades ou convalescents de peste bovine :

— 9 sérums mis sur buvard possédaient 8 jours, 15 jours et 30 jours après l'absorption le même titre d'anticorps IHM que les sérums témoins.

— 9 sérums mis sur buvard possédaient 1 mois et 10 jours après l'absorption le même titre d'anticorps IHM que les sérums témoins.

— 14 sérums mis sur buvard possédaient 50 jours après l'absorption le même titre d'anticorps IHM que les sérums témoins.

— Les 33 sérums de l'expérience mentionnée précédemment (tableau I) testés 60 jours après l'absorption possédaient également le même titre d'anticorps IHM que les sérums témoins.

— Les 28 sérums de l'expérience mentionnée précédemment (tableau II) testés 2 mois et demi après l'absorption se sont comportés comme les sérums témoins.

β) Sérums d'animaux vaccinés :

— 73 sérums d'animaux vaccinés ont montré 1 mois après l'absorption le même titre d'anticorps IHM que les sérums témoins.

— 21 sérums d'animaux vaccinés ont montré 8 jours et 1 mois après l'absorption le même taux d'anticorps IHM que les sérums témoins.

— 10 sérums d'animaux vaccinés ont montré 3 mois et demi après l'absorption une baisse du titre d'anticorps IHM. La différence est encore

TABLEAU N° I

Influence du temps, de la température et de la lumière sur la conservation des anticorps IHM dans les échantillons de sérums récoltés sur papier buvard.

N° des sérums	Sérum témoin conservé à 15° C.	15 jours à température ordinaire	60 J. à 4° C à l'abri de la lumière	60 J. à l'abri de la lumière à température ordinaire	60 J. à la lumière à température ordinaire
1	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	traces 1/2	-
2	+ 1/2 traces 1/4	+ 1/2	+ 1/2 traces 1/4	-	-
3	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-	-
4	-	-	-	-	-
5	+ 1/16	+ 1/16	+ 1/16	-	-
6	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-	-
7	+ 1/2 traces 1/4	+ 1/2 traces 1/4	+ 1/2 traces 1/4	-	-
8	+ 1/4	+ 1/4	+ 1/4	traces 1/2	-
9	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-	-
10	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-	-
11	+ 1/16	+ 1/16	+ 1/16	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	+ 1/16	+ 1/16	+ 1/16	Cassé	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	+ 1/4	+ 1/4	+ 1/4	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	+ 1/8	+1/4-50p.100 1/8	+ 1/8	-	-
22	-	-	-	-	-
23	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-	-
24	-	-	-	-	-
25	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-	-
26	-	-	-	-	-
27	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-	-
28	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-	-
29	-	-	-	-	-
30	+ 1/32	+ 1/32	+ 1/32	-	-
31	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-

TABLEAU N° II

Influence du temps, de la température et de la lumière sur la conservation des anticorps IHM dans les échantillons de sérums récoltés sur papier buvard.

N° des sérums	Sérums témoins conservés à -15° C.	Echantillons conservés pendant 2 mois et demi		
		à la température de 4° C.	à la température ambiante et sous enveloppe	à la température ambiante et à la lumière
1	Traces 1/2	Traces 1/2	-	-
2	+ 1/8	+ 1/8	-	-
3	+ 1/4	+ 1/4	-	-
4	+ 1/2	+ 1/2	-	-
5	+ 1/8	+ 1/8	-	-
6	-	-	-	-
7	Traces 1/2	Traces 1/2	-	-
8	Traces 1/2	Traces 1/2	-	-
9	+ 1/4	+ 1/4	-	-
10	+ 1/4	+ 1/4	-	-
11	-	-	-	-
12	+ 1/2	+ 1/2	-	-
13	Traces 1/2	Traces 1/2	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	+ 1/8	+ 1/8	+ 1/8	-
18	-	-	-	-
19	+ 1/16	+ 1/16	-	-
20	-	-	-	-
21	+ 1/8	+ 1/8	-	-
22	-	-	-	-
23	+ 1/8	+ 1/8	-	-
24	+ 1/4	+ 1/4	-	-
25	+ 1/4	+ 1/4	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-

plus significative 5 mois et 8 jours après (tableau III).

Conclusion : un séjour de 6 semaines à 4 °C ne détruit pas les anticorps IHM contenus dans les sérums absorbés sur papier buvard. Ceci n'est plus vrai après 14 semaines et au-delà.

c) Comportement des sérums absorbés sur papier buvard et conservés à -15 °C.

Les expériences ont été réalisées en utilisant des sérums d'animaux convalescents ou malades de peste bovine. 9, 14 et 30 sérums ont été analysés avec le test IHM, respectivement 40,

50 et 63 jours après l'absorption. Les titres obtenus au bout de ces délais sont les mêmes que ceux des sérums témoins.

Conclusion : pendant les 6 premières semaines les anticorps IHM ne sont pas détruits lorsque le papier buvard est conservé à -15 °C.

CONCLUSION

1° Le papier buvard conserve les anticorps IHM. Ils sont d'autant mieux préservés que les papiers buvards sont placés aussitôt au froid et

TABLEAU N° III
Influence du temps sur la conservation des anticorps IHM.

N° des Sérums	Sérum témoin conservé à -15° C.	Papiers buvards conservés à 4° C.	
		Pendant 3 mois 1/2	Pendant 5 mois et 8 jours
1	+ 1/8	+ 1/4	-
2	+ 1/16	+ 1/8	-
3	+ 1/8	+ 1/4	-
4	+ 1/8 - Traces 1/16	+ 1/4	+ 1/2
5	+ 1/16	+ 1/8	R.N.E.
6	+ 1/4	-	-
7	+ 1/8	+ 1/4	-
8	+ 1/4	-	-
9	+ 1/32	+ 1/16	+ 1/4
10	+ 1/8	+ 1/4	-

R.N.E. = Réaction non effectuée.

à l'abri de la lumière. En effet, la chaleur et la lumière dénaturent au bout d'un certain temps ces anticorps et gênent ainsi l'obtention de réaction IHM positive ou en modifient le résultat quantitatif. Les échantillons de sérums absorbés sur papier buvard devront donc être conservés sous enveloppe sombre, à - 15 °C ou à 4 °C, et devront être utilisés pour le test IHM dans les deux mois qui suivent l'absorption.

2° Ce procédé de récolte des sérums pour envoi d'échantillons au laboratoire, en particulier en vue du diagnostic de peste bovine est particulièrement intéressant pour diverses raisons :

- disparition des risques de casse des flacons et par conséquent des pertes de sérum ;
- rapidité et économie des envois par la poste, sous enveloppe ;
- moindre encombrement des freezers et frigidaires.

3° Il va de soi que la méthode doit être standardisée. Il appartient au laboratoire de tester le papier à utiliser, c'est-à-dire d'éliminer les papiers buvards couleur, de déterminer leur coefficient d'absorption que l'on pourrait définir par la surface exprimée en cm², nécessaire pour absorber 1 ml de sérum. Les papiers buvards seraient ainsi livrés « prêts pour emploi » accompagnés d'une notice explicative.

SUMMARY

Possibilities and limits of the measles haemagglutination inhibition test in the serology of rinderpest.

III. Use of blotting paper in the serology of rinderpest involving MHI test

The difficulties resulting from dispatch of samples to laboratory for the serological diagnosis of Rinderpest can be avoided by using the absorption of serum to be tested on blotting paper strip. A known quantity of serum is absorbed on a known surface of blotting paper. The measles haemagglutination inhibition test is carried out in laboratory by reconstituting the serum to be tested.

RESUMEN

Posibilidades y límites de la reacción de inhibición de la hemaglutinación morbillosa en la serología de la peste bovina.

III. Utilización del papel secante en la serología de la peste bovina empleando la prueba IHM

Se pueden evitar las dificultades del envío de las muestras al laboratorio para el diagnóstico serológico de la peste bovina utilizando la absorción de los sueros a probar sobre una tira de papel secante. Una superficie determinada de papel secante absorbe una cantidad conocida de suero. Se hace en el laboratorio la prueba de inhibición de la hemaglutinación morbillosa (prueba IHM) reconstituyendo el suero a probar.

RÉFÉRENCES

1. ADAMS (E.) et HANSON (R. P.). — A procedure for adsorbing virus neutralizing antibodies on paper discs. *Journ. Bact.*, 1956, **72**, 572.
2. ANDERSON (R. I.), SADUN (C. H.) et WILLIAMS (J. S.). — A technique for the use of minute amounts of dried blood in the fluorescent antibody test for schistosomiasis. *Exp. Parasit.*, 1961, **11** : 111-116.
3. BENSON (T. F.) et MICKLE (E.). — A filter paper disc method for collection of blood samples for serological procedures. *Cornell Vet.*, 1964, **54** : 331.
4. BOGEL (K.), ENDERS-RUCKLE (G.) et PROVOST (A.). — Une réaction sérologique rapide de mesure des anticorps antibovipestiques. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1964, **259** : 482.
5. BOGEL (K.), PROVOST (A.) et ENDERS-RUCKLE (G.). — Hemmagglutinations - Hemmungsreaktion mit Masernantigen bei Rinderpest. I. Anwendung in der Diagnostik. II. Antikörperproduktion nach Inokulation Verschiedener Lebendimpfstoffe beim Rind. *Zentbl. Bakt. I. (Org.)*, 1966, **199** : 1-19 et **201** : 137-152.
6. BRODY (J. A.), Mc ALISTER (R.) et HASELEY (R.) et LEE (P.). — Use of dried whole blood collected on filter paper disc in adenovirus complement fixation and measles hemagglutination inhibition test. *J. Immunology*, 1964, **92** : 854.
7. GAGGERO (A.) et SUTMOLLER (P.). — The use of serum and blood direct on blotting paper in the detection of foot and mouth disease antibody. *Brit. Vet. J.*, 1965, **121**, 509-514.
8. GREEN (R. H.) et OPTON (E. M.). — *Amer. J. Hyg.*, 1960, **72**, 195.
9. KARSTAD (L.), SPALATIN (J.) et HANSON (R. P.). — Application of the paper disc technic to the collection of whole blood and serum samples in studies of eastern equine encephalomyelitis. *J. Infect. Dis.*, 1957, **101**, 295-299.
10. MAURICE (Y.), PROVOST (A.) et BORREDON (C.). — Possibilités et limites de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination morbillose dans la peste bovine (test IHM). I. Interprétation et utilité de la réaction. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1969, **22**, 1 : 1-8.
11. OPPELAR (L.). — Simplified techniques for the extraction of blood and serum from filter paper. *Trop. Geog. Med.*, 1966, **18**, 67-70.
12. OPPELAR (L.). — The use of filter paper as a transport medium for blood and serum. *Trop. Geog. Med.*, 1966, **18** : 60-66.
13. VAISMAN (A.), HAMELIN (A.) et GUTHE (T.). — La technique des anticorps fluorescents pratiquée sur sang desséché et élué. Comparaison avec le F. T. A., le T. P. I. et les épreuves à l'antigène lipidique pratiquées sur le sérum. *Bull. de l'O. M. S.*, 1963, **29** : 1.
14. WORTH (R. M.). — *Amer. Journ. Hyg.*, 1963, **78**, 349.