

SERO-NEUTRALISATION DE SOUS-TYPES A DE VIRUS APHTEUX SUR UN SYSTEME CELLULAIRE. ETABLISSEMENT DES RELATIONS LIANT LE TITRE DU SERUM AU TITRE DU VIRUS. §

par

M. AMIGHI (*), C. STELLMANN (***), M. AMINZADEH (*)
J. SANTUCCI (**), M. HESSAMI(*), M. GIRAUD (***),
A. RAFYI (*) et H. GILBERT (***).

MATERIEL ET METHODES

1° Lignée cellulaire et adaptation du virus.

On utilise une lignée de rein de porc (BD) obtenue au Laboratoire Central de Recherches d'Alfort selon une technique originale (1). Décrite dans sa phase initiale (2, 3), elle est utilisée, depuis 1963, à l'Institut Razi pour l'épreuve de la séro-neutralisation selon des modalités déjà décrites (4).

Actuellement, l'adaptation des virus aphteux est obtenue de façon méthodique en inoculant une série de dilutions de virus lors du premier passage (5).

2° Sérums testés.

Les sérums A. MO n° 1 et 2 et A. 550 n° 1 et 2 sont des sérums de bovins immunisés à l'aide de vaccins monovalents de type Frenkel, prélevés 3 semaines après vaccination. Le sérum A. Iran est un sérum de cobayes hyperimmunisés selon notre technique standard (7).

3° Souches utilisées.

Les souches A. Mo A. 550, A. Iran, O. Turc et SAT 1 sont adaptés et titrés sur cellules BD.

(*) Travail de l'Institut d'Etat des Sérums et Vaccins Razi, Hessek (Iran) (Directeur: Dr M. KAVEH).

(**) Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort (France) (Directeur: Dr A. LUCAS).

(***) Mission en Iran des Instituts Français de la Fièvre Aphteuse (Directeur: Dr C. MACKOWIAK).

§ = Bull. off. int. Epiz., 1968, 69 (1-2), 37-51

Ces souches ont pour diverses origines :

Turquie: Souche A. Moyen Orient - Mahmatli Turquie 1965: A. MO.

Union Soviétique: Souche A. 550 Azerbaïdjan Soviétique 1964: A. 550.

Iran: Souche A. Iran ancien. Shiraz, Iran 1960: A. Iran.

Turquie: Souche O Handiye Turquie 1966: O. Turc.

Turquie: Souche SAT 1 Turquie 1962: SAT 1.

4° *Technique de séro-neutralisation.*

La méthode de séro-neutralisation est la méthode des Instituts Français de la Fièvre Aphteuse (6). Après inactivation à 56° C pendant 30 minutes, le sérum est dilué en tampon phosphate (PBS) selon une progression géométrique de raison 2 ou 4. Le virus à la dilution choisie pour l'expérience est mélangé à parties égales avec les dilutions de sérum. Après homogénéisation, le mélange est laissé pendant une heure à 37° C et une demi-heure à la température du laboratoire, et chaque dilution sérum-virus est inoculée à 4 tubes de cellules.

Le virus entrant dans les réactions subit les mêmes manipulations que les mélanges sérum-virus, ainsi le titre du virus tient compte de la baisse éventuelle de titre dû aux manipulations.

La lecture des résultats est faite à 72 heures. Le calcul est opéré selon la méthode KARBBER (10). Les titres d'anticorps sont exprimés par le logarithme décimal de l'inverse de la dilution des sérums donnant une protection de 50 p. 100 contre le nombre de DECP₅₀ de virus par tube; dans la technique utilisée, diverses dilutions de sérum neutralisent des concentrations variables de virus.

RESULTATS

A. — RELATION STATISTIQUE LIANT LE TITRE SÉRO-NEUTRALISANT ET LE TITRE DU VIRUS.

1° Calcul des équations liant le titre séro-neutralisant *et le titre du virus.*

En utilisant le test de régression (8), nous déterminons l'équation de la droite
 $Y = p X + b.$

Y = titre séro-neutralisant.

X = titre du virus neutralisé exprimé en logarithme.

p = pente de régression.

b = coefficient, fonction de la qualité du sérum.

Pour chaque sérum testé, nous calculons ces équations pour les différentes concentrations de virus mises en réaction. Toutes ces équations sont consignées dans le Tableau I. il est à remarquer que tous les coefficients de corrélation sont hautement significatifs et que les équations ne sont valables que dans les limites de variations.

TABLEAU I

Relations statistique liant le titre du sérum au titre du virus.

Y = Titre du sérum exprimé en logarithme.

X = Titre du virus exprimé en logarithme.

SERUM	No de l'essai	TYPE de virus neutralisé	NOMBRE de dilutions du virus	EQUATION	COEFFICIENT de corrélation
A. MO No 1	1	A. MO	3	$Y = -0.85 X + 2.75$	0.97
A. MO No 1	2	A. MO	8	$Y = -0.90 X + 3.25$	0.982
A. MO No 1	3	A. MO	5	$Y = -0.94 X + 3.66$	0.995
A. MO No 1	4	A. 550	3	$Y = -1.13 X + 2.47$	0.98
A. MO No 1	5	A. Iran	3	$Y = -0.75 X + 1.60$	0.965
A. MO No 2	6	A. MO	3	$Y = -0.88 X + 2.82$	0.97
A. MO No 2	7	A. 550	3	$Y = -0.83 X + 2.58$	0.935
A. 550 No 1	8	A. 550	5	$Y = -1.04 X + 3.36$	0.97
A. 550 No 1	9	A. MO	5	$Y = -0.93 X + 3.25$	0.99
A. 550 No 1	10	A. Iran	5	$Y = -0.25 X + 1.10$	0.99
A. 550 No 2	11	A. 550	3	$Y = -0.87 X + 2.75$	0.995
A. 550 No 2	12	A. MO	3	$Y = -0.82 X + 2.58$	0.88
A. Iran No 1	13	A. Iran	3	$Y = -0.51 X + 2.98$	0.999
A. Iran No 1	14	A. MO	3	$Y = -0.38 X + 2.12$	0.98
A. Iran No 1	15	A. 550	3	$Y = -0.62 X + 2.43$	0.975

TABLEAU II

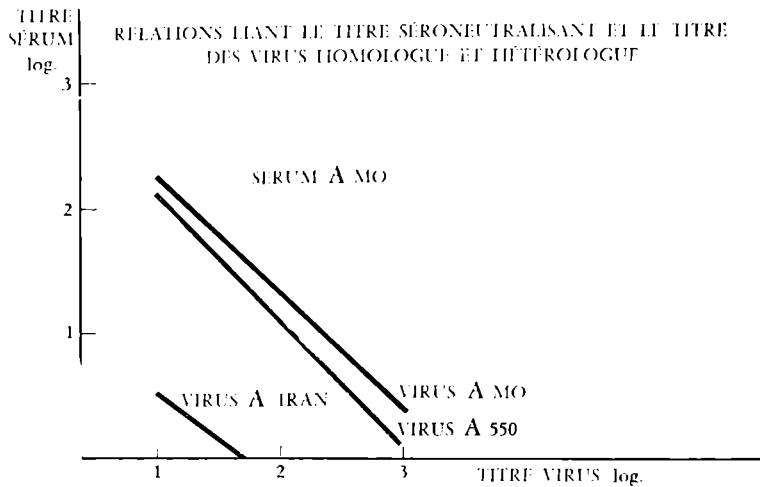
Pentes moyennes des relations liant le titre des sérums au titre des virus homologues et hétérologues.

Sérum \ Virus	Virus		
	A. MO	A. 550	A. Iran
A. MO	- 0,94	- 1,01	- 0,75
A. 550	- 0,91	- 0,92	- 0,25
A. Iran	- 0,38	- 0,62	- 0,51

2° Comparaison des pentes des équations.

En calculant la moyenne pondérée de la pente de chaque couple de sérum-virus, nous obtenons les valeurs consignées dans le Tableau II et représentées dans les Figures n^{os} 1, 2 et 3.

FIGURE N° 1



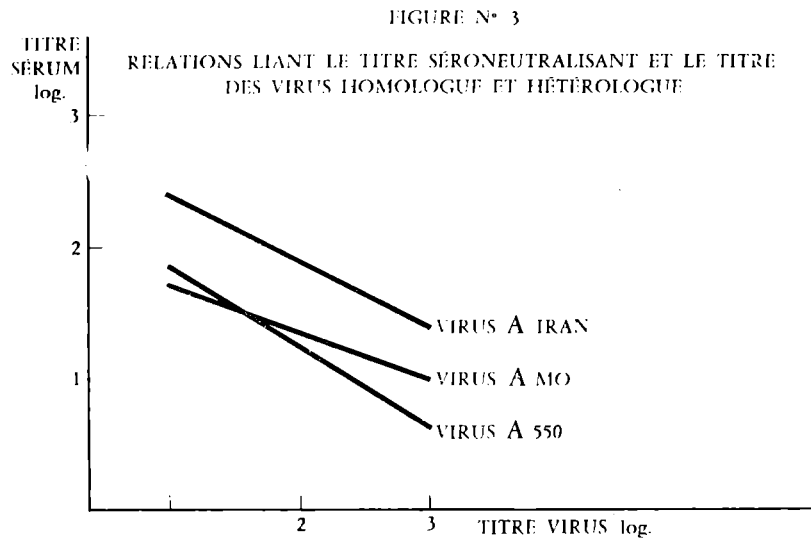
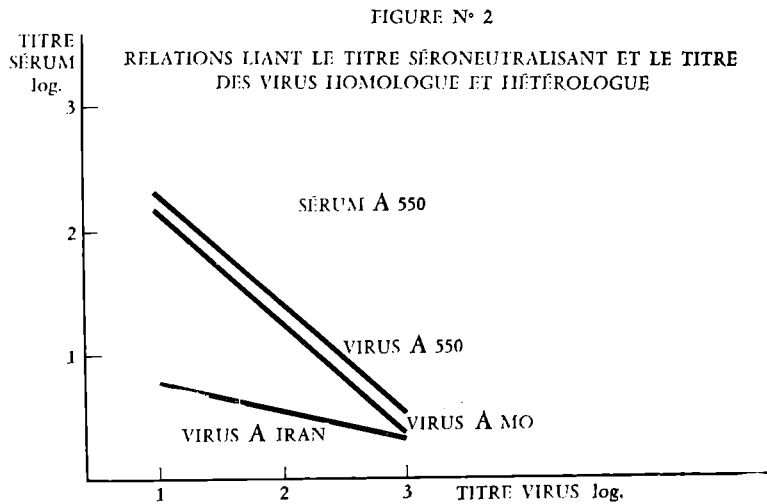
Il ressort des comparaisons de ces pentes qu'elles ne sont pas toutes parallèles et que plusieurs système sérum-virus sont à considérer.

— D'une part, les pentes des systèmes:

Sérum A. MO: Virus. A. MO, Virus A. 550

Sérum A. 550: Virus A. 550. Virus A. MO

ne sont pas statistiquement différentes, et la pente moyenne de ces systèmes est égale à $- 0,92 \pm 0,06$ (probabilité 0,95).



— D'autre part, les pentes des autres systèmes sont statistiquement différentes qui font intervenir soit le sérum, soit le virus A. Iran.

Cette observation peut être le fait de l'origine différente du sérum A. Iran préparé sur cobayes hyperimmuns et des sérums A. MO et A. 550 préparés sur bovins immuns.

Par contre, un tel problème n'intervient pas en ce qui concerne les pentes dues au virus A. Iran statistiquement inférieures aux pentes des autres virus, alors que les 3 virus utilisés ont été préparés selon la même technique.

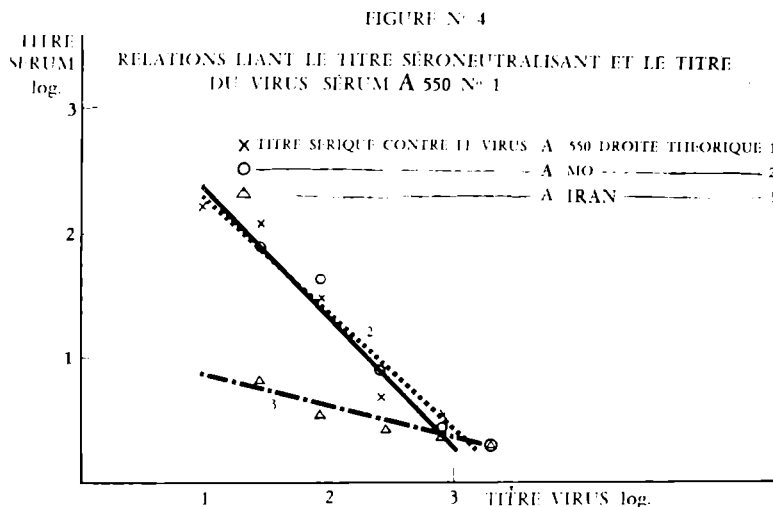
Le non-parallélisme des pentes, selon les systèmes sérum-virus considérés, entraîne diverses conséquences:

—Lorsqu'on désire étudier le rapport des titres séro-neutralisants hétérologues
homologues de sérums, il faut toujours se placer à un même titre de virus neutralisé, sinon ce rapport n'aura pas de signification;

— Lorsqu'on compare des systèmes homologues et hétérologues, la méthode des index de neutralisation est à rejeter car nous obtenons des index de neutralisation identiques pour des systèmes différents (voir Fig. 1, 2, 3).

3° Correction du titre sérique par rapport à une quantité constante de virus.

Nous pouvons admettre dans nos limites expérimentales que l'hypothèse de linéarité est valable pour la relation liant le titre d'un sérum au titre du virus neutralisé comme l'atteste la Figure 4 mise comme exemple.



Ceci nous autorise à exprimer nos titres sériques par rapport à une quantité constante de virus par tube; nous avons choisi une dose de virus suffisamment importante pour que les cellules subissent un effet cytopathogène de telle manière que la réaction soit sensible: soit 10 DECP₅₀ par tube.

Dans la pratique, si la quantité de virus réellement neutralisée est comprise entre 5 et 20 DECP₅₀ par tube (précision sur le titre du virus $\pm 0,35$), aucune correction n'est apportée. Si la quantité de virus neutralisé dépasse ces limites, la

relation linéaire nous permet de corriger les titres des sérums, dans la mesure où elle a été statistiquement démontrée.

Pour ce faire, nous considérons la pente p du système testé. La différence Δy du titre sérique y sera fonction de Δx différence du titre du virus observé par rapport au titre théorique de 10 DECP₅₀ = 1. Ainsi, l'équation est $\Delta y = p \Delta x$. Pour le système sérum A. 550 virus A. 550, nous avons calculé que la pente moyenne était de $-0,92$.

Par exemple, soit un titre d'un sérum A. 550 de 1,45 contre un titre de virus neutralisé de 100 DECP₅₀ = 2. Nous corrigeons ce titre par le calcul suivant:

$$\begin{aligned}\Delta y &= -0,92 \Delta x. \\ \Delta x &= 1 - 2 = -1. \\ \Delta y &= (-0,92) (-1) = +0,92.\end{aligned}$$

Le titre séro-neutralisant corrigé du sérum contre 10 DECP₅₀ sera:
 $y = 1,45 + 0,92 = 2,37$.

B. — COMPARAISON DES TITRES SERO-NEUTRALISANTS HOMOLOGUES ET HÉTÉROLOGUES.

APPLICATION A LA SÉRO-DIFFÉRENCIATION.

1° Titre séro-neutralisant homologue et hétérologue des systèmes testés.

En exprimant les titres séro-neutralisants des sérums contre 10 DECP₅₀ après correction éventuelle, nous obtenons diverses valeurs moyennes consignées dans le Tableau III.

TABLEAU III

Titre séroneutralisant moyen des sérums testés contre 10 DECP₅₀ de virus homologue ou hétérologue.

Sérum	Virus				
	A. MO	A. 550	A. Iran	A. Turc	SAT I
A. MO N° 1	2,30 +		0,72	0,55	0,30
A. MO N° 2	1,94	1,76			
A. 550 N° 1	2,20	2,30	0,86	0,1	0,8
A. 550 N° 2	1,77	1,89			
A. Iran	1,74	1,81	2,47	0	0

+ Tous ces titres sont connus à $\pm 0,20$ à la probabilité 0,95.

2° Estimation de la précision et du pouvoir séparateur de notre méthode.

Les calculs de variance liée de nos systèmes de régression, c'est-à-dire le calcul de la précision sur l'ensemble de nos résultats expérimentaux, nous ont amené aux valeurs suivantes:

$$s \cdot \frac{2}{y} = 0,009, \text{ soit } s'y = 0,095 \text{ et } 2 s'y = \pm 0,20 \text{ (1).}$$

$$s \cdot \frac{2}{x} = 0,03, \text{ soit } s'x = 0,175 \text{ et } 2 s'x = \pm 0,35.$$

$2 s'y$ déterminent les limites (1) du titre de sérum testé contre une seule dose de virus donnée.

$2 s'x$ déterminent les limites (1) du titre de virus testé contre une seule dose de sérum donnée (expression de l'index de neutralisation).

Par ailleurs, ces derniers calculs démontrent que la méthode de séro-neutralisation à virus fixe est plus précise que la méthode à virus variable.

Le pouvoir séparateur (11) de notre étude sur le titre séroneutralisant estimé avec une dose de virus est égal à:

$$\Delta = 2 \sqrt{2 s' \cdot \frac{2}{y}} = 0,28 \text{ (1)}$$

ce qui exprime que deux titres séro-neutralisants seront considérés comme significativement différents (1), dans ce présent travail, lorsque leur différence sera supérieure à 0,28.

3° Comparaison des titres hétérologues et homologues.

A partir des données du Tableau III, nous effectuons les différences des titres des divers systèmes sérum-virus. Ces valeurs sont consignées dans le Tableau IV.

Ce Tableau IV appelle certains commentaires:

— Les séro-neutralisations croisées entre virus A. MO et A. 550 ne sont pas statistiquement différentes puisque les différences des titres homologues et hétérologues sont inférieures à 0,28, pouvoir séparateur de notre méthode, ce qui démontre sinon leur identité, tout au moins une étroite parenté.

1. Probabilité: 0,95.

TABLEAU IV
Significativité statistique des différences des titres séroneutralisants
homologues/hétérologues.

Virus Sérum	A. MO	A. 550	A. Iran	O. Turc	SAT 1
A. MO	0	0 10 +	1,58 + +	1,75 + +	2 + +
A. 550	0,11 +	0	1,44 + +	2,20 + +	1,50 + +
A. Iran	0,73 + +	0,66 + +	0	2,47 + +	2,47 + +

+ Différence non significative au seuil de probabilité 0,95
 + + Différence significative au seuil de probabilité 0,95.

— Rappelons que DAVIE (12) définit une différence antigénique marquée entre 2 souches lorsque celles-ci présentent entre leurs titres séro-neutralisants croisés une différence du quadruple, soit 0,6 en logarithme. Selon ces normes, nous observons que le système A. Iran s'éloigne radicalement des systèmes A. MO et A. 550 pour atteindre des différences proches de celles observées avec des types différents.

En effet, il est intéressant de noter, dans le Tableau III, que les titres hétérotypiques des sérums vis-à-vis des types O et SAT 1 peuvent atteindre des valeurs non négligeables.

On peut penser que l'action inhibitrice de ces sérums n'est peut-être pas due dans ce cas à des réactions antigène-anticorps mais à une inhibition non spécifique.

4^e Expression de la parenté sérologique
 sous la forme du rapport $R = 100 \sqrt{rA \times rB}$
 en valeur arithmétique.

Nos titres sériques étant exprimés en logarithmes pour uniformiser les résultats avec ceux de la fixation du complément (9), nous obtenons les rapports arithmétiques rA et rB $\frac{\text{titre hétérologue}}{\text{titre homologue}}$ en calculant l'antilogarithme de la différence titre hétérologue moins titre homologue.

Le Tableau V donne les valeurs des rapports $\frac{\text{titre hétérologue}}{\text{titre homologue}}$ de nos divers système sérum-virus.

TAB_ LEAU V

Valeur des rapports arithmétiques r_A et $r_B = \frac{\text{titre hétérologue.}}{\text{titre homologue.}}$

Sérum \ Virus	A MO	A.550	A. Iran	SAT 1	0
A.MO	1	0,66	0,025	0,010	0,018
A.550	0,77	1	0,037	0,030	0,006
A. Iran	0,185	0,22	1	0,003	0,003

Pour un couple de virus donné A et B, les valeurs de r_A et r_B permettent de calculer le rapport $R = 100 \sqrt{r_A \times r_B}$ qui est l'expression de la parenté antigénique entre les deux souches ainsi que cela a été établi pour la fixation du complément (9).

Le Tableau VI contient les valeurs de R pour les trois souches A étudiées.

Dans le même Tableau VI, nous avons placé les résultats obtenus en fixation du complément avec ces m'emes souches pour montrer l'identité des conclusions que l'on peut tirer des deux techniques sérologiques employées.

A savoir que les deux souches A. MO et A. 550 font partie du sous-type A. 22 sans pouvoir être différenciées et que la souche A. Iran présente une différence antigénique marquée par rapport à ce sous-type A. 22.

TAB_ LEAU VI

Valeur du rapport $R = 100 \sqrt{r_A \times r_B}$ pour chaque couple de sérum-virus.

Sérum \ Virus	A.MO	A.550	A.Iran
A. Iran.	100	—	—
A. MO.	71 + 66 ++	100	—
A. 550.	6,8 + 35 ++	9 + 22 ++	100

+ Valeur en séro-neutralisation croisée.

++ Valeur en fixation du complément.

Néanmoins, il est intéressant de noter qu'en fixation du complément, nous avons travaillé avec des sérums de cobayes hyperimmuns, alors qu'en séro-neutralisation croisée, sauf pour le sérum A. Iran, nous avons travaillé avec des sérums de bovins immuns.

Selon une loi statistiquement démontrée, nous avons précisé que le titre neutralisant d'un sérum anti-aphteux est inversement proportionnel à la quantité de virus entrant dans la réaction (séro-neutralisation sur un système cellulaire défini).

Selon les normes actuellement établies en fixation du complément (9), nous procédons à la séro-neutralisation croisée des 2 souches A et B d'un même type de virus et de leur sérum en établissant les rapports:

$$rA = \frac{\text{Titre hétérologue (sérum A} \times \text{virus B)}}{\text{Titre homologue (sérum A} \times \text{virus A)}}$$

$$rB = \frac{\text{Titre hétérologue (sérum B} \times \text{virus A)}}{\text{Titre homologue (sérum B} \times \text{virus B)}}$$

Puis on établit la position relative des deux souches dans le cadre du type en établissant la valeur $R = 100 \sqrt{rA \times rB}$.

Nous poursuivons actuellement notre étude avec des sérums de bovins immuns et hyperimmuns sur différentes souches A du Moyen-Orient. En effet, il paraît préférable de travailler sur sérums bovins, les bovins étant naturellement sensibles à la Fièvre aphteuse, et non pas à partir de sérums cobayes qui peuvent ajouter un facteur d'incertitude supplémentaire dû à l'espèce.

* * *

RESUME

Une relation liant le titre séro-neutralisant de sérum anti-aphteux au titre du virus neutralisé est statistiquement démontrée. L'expression du titre d'un sérum par rapport à une dose de virus donnée peut être corrigée par suite de l'existence d'une relation linéaire entre le titre du sérum et le titre du virus neutralisé.

Une étude des méthodes de séro-neutralisation montre la supériorité de la méthode à virus fixe sur la méthode à virus variable.

Pour les trois souches étudiées, les relations sont différentes selon les systèmes sérum-virus testés. Les titres séro-neutralisants croisés des sérums A. Moyen-Orient et A. 550 ne sont pas statistiquement différents, montrant ainsi une parenté sinon une identité sérologique. La souche A. Iran paraît différente sérologiquement des précédentes. Ces résultats confirment ceux obtenus en fixation du complément.

* * *

SUMMARY

A relation between the seroneutralizing titre of anti FMD serum and the titre of neutralized virus is statistically established. The expression of the titre of a serum in relation to a given dose of virus may be corrected due to the existence of a linear relation between the titre of the serum and the titre of the neutralized virus.

A study of the methods of seroneutralization shows the superiority of the constant virus method on the method with variable virus.

For the three strains studied, the relations are different according to the serum-virus systems tested. The crossed seroneutralizing titres of the A. M^O and A. 550 sera are not statistically different, so showing a relationship if not a serologic identity.

The A. Iran strain seems different serologically from the two previous strains. These results confirm those obtained through complement fixation.

* * *

RESUMEN

Se demuestra estadísticamente la relación que une el título de suero antiaftoso al título del virus neutralizado. La expresión del título de un suero con relación a una dosis dada de virus puede ser corregida como consecuencia de la existencia de una relación lineal entre el título del suero y el título del virus neutralizado.

El estudio de los métodos de seroneutralización pone de manifiesto la superioridad del método por virus fijo que el método por virus variable.

Para las 3 cepas estudiadas, las relaciones son distintas según los sistemas suero-virus experimentados. Los títulos seroneutralizantes cruzados de los sueros A. Medio Oriente y A. 550 estadísticamente no se diferencian, haciendo así ostensible no sólo el parentesco sino la identidad serológica. La cepa A. Iran parece que serológicamente es distinta las anteriores. Estos resultados confirman aquellos logrados en fijación del complemento.

* * *

BIBLIOGRAPHIE

1. SANTUCCI (J.) HAAG (J.), CHOAY (J.) & THELY (M.)— *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1962, **254**, 955-957.
2. HAAG (J.) & SANTUCCI (J.). — *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1962, **254**, 1485-1487.
3. HAAG (J.) & SANTUCCI (J.) — *Sem. des Hop., Annales de Génétique*, 1964, **7**, 671-673.
4. SANTUCCI (J.), AMIGHI (M.), GILBERT (H.), MASTAN (M. B.), HESSAMI (M.), HAAG (J.) & CHAFYI (A.). — *Bull. Off. int. Epiz.*, 1965, **63** (3-4), 469-475.
5. AMIGHI (M.), DUBOUCLARD (C.), ROUMANTZEFF (M.), FONTAINE (J.) & LANG (R.). — *Rev. Immunol.*, 1966, **30** (3), 131-140.

6. MACKOWIAK (C.) & LANG (R.). — *Bull. Off. int. Epiz.*, 1958, **49**, 99-106.
7. GILBERT (H.), ROUMIANTZEFF (M.), TERRE (J.) & AMIGHI (M.) — *Rev. Immunol.*, 1966, **30** (1-2), 31-44.
8. SCHWARTZ (D.) — Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. *Editions médicales Flammarion Paris*, 1963.
9. *Symposium international de la Section de Standardisation Microbiologique. Variantes et immunité dans la Fièvre aphteuse, Lyon 14 juillet 1967.*
10. KARBER (G.). — *Arch. exp. Path. Pharmac.*, 1931, **162**, 480-483.
11. TERRE (J.), STELLMANN (C.), BORNAREL (P.), ROUMIANTZEFF (M.), FAVRE (H.), FONTAINE (J.) & MACKOWIAK (C.). — *Réunion annuelle du groupe de recherches F.A.O. contre la Fièvre aphteuse*, Pirbright, 14-16 septembre, 1966, 11-37.
12. DAVIE (J.). — *Réunion annuelle du groupe de recherches F.A.O. contre la Fièvre aphteuse*, Pirbright, 14-16 septembre 1966, 119-123.
13. RAFYI (A.), GIRAUD (M.), KAVEH (M.), SANTUCCI (J.), ARSHADI (M.), AMIGHI (M.), GILBERT (H.) & STELLMANN (C.). — *Bull. Off. int. Epiz.*, 1967, **67** (5-6), 681-960.