

**SERODIFFERENCIATION des VARIANTES
du VIRUS de la FIEVRE APHTEUSE
par la TECHNIQUE des PLAGES**

— Méthode de Wecker — §

AMINZADEH, M.+

DUBOUCCLARD, C. ++ & ROUMIANTZEFF, M. ++

La technique de sérodifférenciation est depuis longtemps appliquée à l'étude des virus poliomyélitiques, notamment pour comparer les différentes souches à l'intérieur d'un même type. Deux méthodes ont été utilisées: la séroneutralisation croisée (3, 7, 13, 14, 15) et l'établissement des vitesses de séroneutralisation croisée (6).

La méthode de Wecker, dans laquelle l'inhibition de la formation des plages de virus est mesurée en incorporant l'antisérum dans le milieu gélosé, a été utilisée pour étudier les parentés reliant 5 souches de virus aphteux de type "O".

La méthode de MC BRIDE fera l'objet d'une prochaine étude.

I. MATERIEL et METHODES

1. VIRUS

Les virus O Flandres 47, O Sicile 58, O Espagne 64, O Lausanne 65 et O Bruges 63 ont été préparés sur culture de lignée cellulaire BHK 21: deux passages sur culture primaire de cellules de rein de porc et trois passages sur lignée cellulaire BHK 21 (5). Avant utilisation, les virus sont filtrés sur membrane Millipore 0,22 μ et répartis en flacons de 10 ml dont deux flacons sont décongelés lors de chaque utilisation.

2. SERUMS

Ce sont des sérums hyperimmuns de cobaye préparés pour les réactions de

+ = Institut Razi, Téhéran, IRAN: Directeur, Prof. M. KAVEH.

++ = Institut Français de la Fièvre Aphteuse, Lyon: Directeur, Dr. Vet. C. Mackowiak.

§ = Présentée par Dr. M. Aminzadeh au Symposium Inter. de Viro. "Lyon Juil. 1967".

fixation du complément (4), correspondant aux virus précités et utilisés après filtration sur filtre Millipore 0,22 μ .

3. CULTURE de TISSUS

Les cultures primaires de cellules de rein de porc sont préparées en flacons de Schott ou MDB (surface 40 cm², volume 150 cm³). Chaque flacon est inoculé avec 25 ml de suspension cellulaire contenant 200,000 cellules par millilitre. Le milieu de culture est le suivant:

— **Earle**

. Hydrolysate de Lactalbumine	0,5 %
. Pénicilline	200,000 ui/litre
. Streptomycine	50 mg/litre
. Sérum de veau sans anticorps antiaphteux:	5 %

A partir du 6^{ème} jour, la couche cellulaire étant complète, les flacons sont utilisés.

4. TECHNIQUE des PLAGES

Le milieu de croissance des cellules est éliminé et la couche cellulaire rincée avec une solution saline de Earle contenant 0,5% d'hydrolysate de Lactalbumine.

Chaque flacon est inoculé avec 0,1 ml de la dilution de virus choisie. Après une adsorption de 20 minutes à la température de 37° avec agitation des flacons toutes les 5 minutes, on ajoute par flacon 15 ml de milieu gélosé maintenu à 43°.

Le milieu gélosé est préparé en mélangeant les milieux suivants I et II.

Préparation du milieu I

— Spécial Agar Noble "Difco"	2,7 gr.
— Rouge neutre: 0,1 %	3 ml
— Eau distillée	130 ml

Autoclaver à 115° pendant 30 minutes, avant emploi.
Refroidir le milieu à 43°.

Préparation du milieu II

Préparer extemporanément le milieu suivant et le porter à 43°.

— Earle (10 x c)* sans rouge de phénol	20 ml
— Lactalbumine (5 x c)*	40 ml

- Sérum de veau (sans anticorps contre la fièvre aphteuse) 10 ml
- Antibiotiques: pénicilline } 0,35 ml
- streptomycine }
- Bicarbonate 5,6 % 5 ml

Les flacons sont conservés à la température du laboratoire jusqu'à solidification de la gélose, puis mis à l'étuve à 37° pendant 72 heures. On compte alors le nombre de plages par flacon et, parallèlement, on mesure le diamètre moyen des plages.

5. TITRAGE des VIRUS

- Le virus est dilué dans le même type de milieu ayant servi au rinçage des cultures cellulaires et 0,1 ml de chaque dilution est inoculé par flacon (3 flacons par dilution, intervalle logarithmique de dilution: 0,6) Le calcul du titre s'effectue en employant la méthode des équivalents boîtes (11).

* 10 x c } 10
 * 5 x c } et 5 fois concentré.

- La dilution d'emploi de ce virus pour la sérodifférenciation sera telle que, sous un volume de 0,1 ml, il y aura 20 plages par boîte. La constance de cette valeur est vérifiée par deux ou trois essais.

6. TITRAGE des SERUMS

a) Méthode

Les flacons sont inoculés avec 0,1 ml de la dilution de virus choisie et, après adsorption, on ajoute de la gélose contenant du sérum à titrer à différentes concentrations, afin que la dilution finale de ce sérum dans la gélose soit de 1/5, 1/10, 1/20...

Parallèlement, on prépare des témoins cellules et des témoins virus.

b) Mesure du pouvoir neutralisant du sérum

Nous avons repris les données de PLCTKIN et coll. (9) et avons essayé de les adapter pour l'analyse de nos résultats.

- α) D'une part, le sérum empêche l'apparition d'une partie des plages du virus. Le rapport $\frac{N_s}{N_c}$ (N_s = nombre de plages dans les flacons contenant le sérum et N_c = nombre de plages dans les flacons témoins virus) nous donne une valeur reflétant le pouvoir neutralisant du sérum, mesuré par la diminution du nombre des plages. La valeur $K = \log \frac{N_s}{N_c}$

$\frac{Ns}{Nc}$ correspond à l'équation fondamentale de l'abaissement du titre d'un virus par le sérum:

$$K = \log \frac{V \text{ (titre du virus résiduel)}}{V_0 \text{ (titre du virus initial)}} \quad (2).$$

β) D'autre part, le sérum inhibe le développement des plages de virus ce qui se manifeste par une diminution de leur diamètre. Le rapport $\frac{Ds}{Dc}$ (D_s = diamètre des plages dans les flacons contenant du sérum et D_c = diamètre des plages dans les flacons témoins virus) donne une valeur reflétant aussi le pouvoir neutralisant du sérum, mesuré par la réduction du diamètre des plages. Cette valeur $K_{D'}$ en règle gé-

nérale plus importante que K_N est calculée de la même façon que le rapport K_N soit $K_{D'} = \log \frac{Ds}{Dc}$.

8) L'expression du pouvoir neutralisant du sérum est la résultante de deux valeurs: la première concernant l'aptitude du sérum à empêcher l'apparition d'un certain nombre de plages, la deuxième concernant l'aptitude du sérum à inhiber le développement des plages. La valeur intrinsèque neutralisante du sérum-pouvoir neutralisant- doit donc tenir compte de ces deux facteurs et la méthode la plus logique semble être de faire la moyenne de ces valeurs logarithmiques $K = \frac{K_N + K_{D'}}{2}$

c) **Choix de la dilution du sérum** (figure n° 1)

Cette méthode de calcul du pouvoir neutralisant du sérum a été utilisée de préférence à la méthode du RIST (9) car elle permet d'objectiver le pouvoir neutralisant du sérum et d'exprimer sa valeur de façon classique.

La dilution de sérum choisie est celle qui donne une valeur K proche de 1. Ce point sera discuté plus loin.

7. REACTION de WECKER

a) **Réaction proprement dite**

Dans une étude croisée complète, chaque virus est inoculé dans 5 séries de 3 flacons. Le sérum homologue est ajouté dans la gélose de la première série et les sérums hétérologues dans la gélose des autres séries selon le protocole illustré par la figure n° 2.

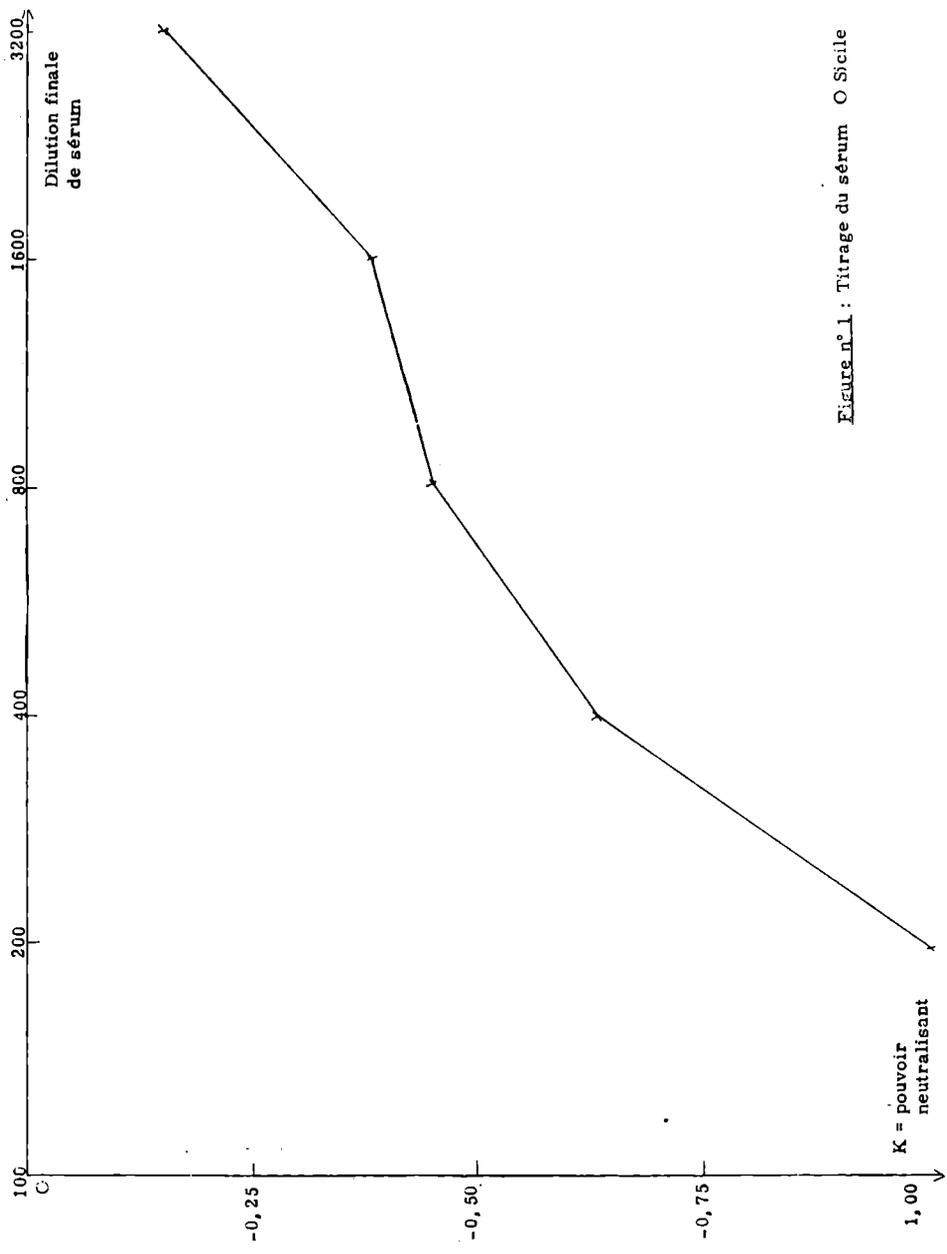


Figure n°1 : Titrage du sérum O Sicile

b) **Interprétation**

— Le calcul du pouvoir neutralisant K, pour chaque sérum vis-à-vis de tous les virus, est effectué de la même façon que lors du titrage de sérum. Pour chaque sérum, le pouvoir neutralisant homologue et les pouvoirs neutralisants hétérologues sont déterminés.

— **L'indice de neutralisation** (r) pour chaque sérum vis-à-vis de chaque virus est ainsi établi :

$$r = \frac{\text{pouvoir neutralisant hétérologue}}{\text{pouvoir neutralisant homologue}} \text{ (rapport compris entre 0 et 1).}$$

— L'établissement de la **parenté des souches de virus** du point de vue neutralisant est fait selon la méthode décrite par WENNER (4, 15) et déjà employée pour la séroneutralisation des virus aphteux par UBERTINI (12) :

Moyenne géométrique des valeurs

$$r_1 = \frac{\text{pouvoir neutralisant du sérum A vis-à-vis du virus B}}{\text{pouvoir neutralisant du sérum A vis-à-vis du virus A}}$$

$$\text{et } r_2 = \frac{\text{pouvoir neutralisant du sérum B vis-à-vis du virus A}}{\text{pouvoir neutralisant du sérum B vis-à-vis du virus B}}$$

$$\text{soit } R = 100 \sqrt{r_1 \times r_2}$$

II. **RESULTATS**

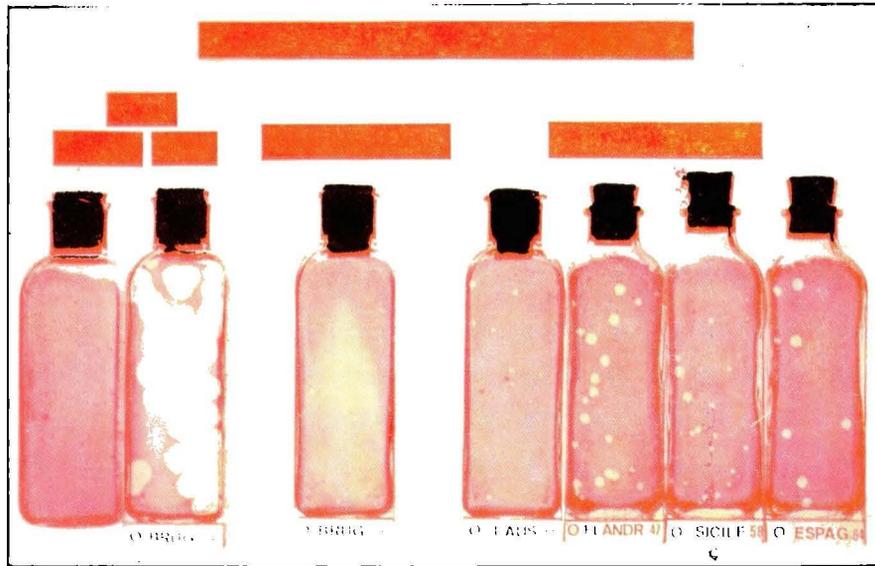
— Six à huit essais croisés ont été effectués entre les souches O Flandres 47, O Sicile 58, O Espagne 64, O Lausanne 65 et O Bruges 63.

— La figure n° 2 donne les valeurs moyennes "r" établies sur 6 à 8 essais croisés.

— La figure n° 3 rassemble les résultats de la parenté sérologique "R" des souches étudiées.

III. **DISCUSSION**

La méthode de sérodifférenciation utilisant la technique de formation des plages décrite par WECKER pour les virus poliomyélitiques nous a conduits à des résultats proches de ceux donnés par la réaction de fixation du complément quantitative.



SERODIFFERENCIATION AVEC LE SERUM O BRUGES 63

Pour diminuer les variations de la méthode de sérodifférenciation, il est important de préciser les points suivants :

1. Le titre du virus témoin est à déterminer en utilisant un plus grand nombre de boîtes (par exemple 6), ce qui permet d'augmenter la précision des moyennes du nombre et du diamètre des plages,
2. La dilution du sérum est à déterminer, dans un titrage préliminaire. Il est recommandé de choisir une dilution de sérum telle que l'on ait, dans le titrage en présence du sérum homologue, une valeur $K \frac{N}{N}$ voisine 0,50, c'est-à-dire un nombre de plages égal à la moitié du nombre de plages du témoin sans sérum.

Dans ces conditions, il est possible d'obtenir un nombre suffisant de plages qui permette de déterminer une valeur moyenne D_s précise.
3. Effectuer la réaction bilatérale de tous les sérums vis-à-vis de tous les virus dans une même série de réactions.

IV. CONCLUSIONS

Nous avons utilisé la méthode de sérodifférenciation selon WECKER et nous nous sommes inspirés des travaux de PLOTKIN pour l'interprétation des résultats.

Cette étude préliminaire nous a permis de préciser les conditions expérimentales dans lesquelles il convient de travailler. Malgré les variations de la méthode, les valeurs moyennes relatives à la parenté sérologique sont très proches de celles que donne la réaction de fixation du complément.

Cependant, cette méthode est beaucoup plus intéressante avec les sérums bovins d'animaux primo-vaccinés non utilisables dans la réaction de fixation du complément.

RESUMÉ

La méthode de WECKER, dans laquelle l'inhibition de la formation des plages de virus est mesurée en incorporant l'antisérum dans le milieu gélosé, a été utilisée pour étudier les parentés reliant 5 souches de virus aphteux de type "O". Chaque virus préalablement préparé sur cellules BHK 21 est inoculé dans 5 séries de flacons. Les sérums homologues et hétérologues, d'origine cobaye, sont ajoutés individuellement dans la gélose de chacune des séries.

L'indice de neutralisation (r) pour chaque sérum vis-à-vis de chaque virus est ainsi établi $r = \frac{\text{pouvoir neutralisant hétérologue}}{\text{pouvoir neutralisant homologue}}$ (compris entre 0 et 1)

Pour deux souches de virus, du point de vue neutralisant, on arrive à la notion de parenté qui est la moyenne géométrique $R = 100 \sqrt{r_1 \times r_2}$

Les valeurs moyennes relatives à la parenté sérologique sont très proches de celles que donne la réaction de Fixation du Complément.

Cette méthode semble devoir être beaucoup plus intéressante avec les sérums de bovins primo-vaccinés non utilisables dans la réaction de Fixation du complément.

Summary

Serological differentiation of FMDV sub types by Plaque technique

Wecker method has been used throughout the experiment and results are recovered according to Plotkin.

In spite of some variations, results in both plaque technique and complement fixation test are almost the same.

Plaque technique is superior to CF. test; especially when sera from animals vaccinated once against FMD are checked.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les techniciens de l'I.F.F.A. pour leur précieux concours et tout particulièrement Mademoiselle C. GIRARDON.

Souches	O Flandres 47	O Sicile 58	C Espagne 64	O Lausanne 65	O Bruges 63
C Flandres 47	100	26	35	44	32
O Sicile 58		100	49	29	25
C Espagne 64			100	45	38
O Lausanne 65				100	89
O Bruges 63					100

Figure no 3 : Parenté sérologique R entre les différentes souches

- O Flandres 47,
- O Sicile 58,
- O Espagne 64,
- O Lausanne 65,
- O Bruges 63.

virus sérum	O Flandres 47	O Sicile 58	O Espagne 64	O Lausanne 65	O Bruges 63
O Flandres 47	- 1	- 0,30	- 0,26	- 0,41	- 0,41
O Sicile 58	- 0,23	- 1	- 0,37	- 0,22	- 0,26
O Espagne 64	- 0,47	- 0,66	- 1	- 0,51	- 0,63
O Lausanne 65	- 0,48	- 0,36	- 0,41	- 1	- 0,99
O Bruges 63	- 0,26	- 0,23	0,23	- 0,79	1

Figure no 2 : valeur des indices de neutralisation

$$r = \frac{\text{pouvoir neutralisant homologue}}{\text{pouvoir neutralisant hétéologue}}$$

- Virus : — O Flandres 47
— O Sicile 58
— O Espagne 64
— O Lausanne 65
— O Bruges 63
- Sérums correspondants.

BIBLIOGRAPHIE

1. COTTRAL G.E., PATTY R.E., GAILIUNAS P., SCOTT F. W.
Relationship of Foot and Mouth Disease virus plaque size on cells cultures to infectivity for cattle by intramuscular inoculation.
— Arch. Virusforschung, **18** (3), 1966, p. 276-293.
2. DULBECCO R., VOGT M., STRICKLAND A.
A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus.
— Virology, **2**, 1956, p. 162-205.

3. GARD S.
Immunological strain specificity within type 1 poliovirus.
—B Bull. O.M.S., 22, 1960, p. 235-42.
4. GILBERT H., ROUMIANTZEFF M., TERRE J., AMIGHI M.
Préparation de sérums hyperimmuns de cobayes nécessaires à la réaction de fixation du complément en matière de fièvre aphteuse. Rôle adjuvant de la souche Brucella B 19.
— Rev. Immunol., 30, 1966, p. 31-44.
5. LANG R., DUBOUCARD C., STELLMANN C., LEFTHERIOTIS E., ROUMIANTZEFF M., PETERMANN H.G., FONTAINE J., BRANCHE R.
Emploi des cellules BHK 21 en virologie.
— Ière réunion Ass. Fr. Vét. Microb. et spécial. Mal. Infect. Alfort, 12 mars 1966.
6. Mc BRIDE W.D.
Antigenic analysis of poliovirus by kinetic studies of serum neutralization.
— Virology, 7, 1959, p. 45-58.
7. MELNICK J.L.
Problems associated with the use of live poliovirus vaccine.
— Am. J. Public. Health, 50, 1960, 1013-31.
8. MIRCHAMSY, H. and TASLIMI H.
The formation of plaques by african horse sickness viruses and factors affecting plaque size.
J. Comp. Med. and Vet. Sci., 30, 1966, p. 47-51.
9. PLOTKIN S.A., COHEN B.J. and KOPROWSKI H.
Intratypic serodifferentiation of polioviruses.
— Virology, 15, 1961, p. 473-85.
10. SOHIER R.
Diagnostic des maladies à virus.
— Paris, Ed. Médicale Flammarion, 1964.
11. SCHWARTZ D.
Cours C.E.S.A.M.E., Paris.
12. UBERTINI B., NARDELLI L., DAL PRATO A., PANINA G., SANTERO G.
Subtype variation of Foot and Mouth Disease virus and vaccination.
— Wiener Tierärztliche Monatschrift, 51, 1964, p. 99-110.
13. WECKER E.
A simple test for serodifferentiation of poliovirus strains within the same type.
— Virology, 10, 1959, p. 376-79.
14. WENNER H.A., KAMITSUKA P., LENAHAN M., MELNICK J.L.
A comparative study of type 2 poliomyelitis viruses. II - antigenic differences relating to 18 types II strains.
J. Immunol. 77, 1956, p. 220-31.
15. WENNER H.A., ARCHETTI I., DUBES G.R.
Antigenic variations among type 1 polioviruses. A study of 16 wild type strains and 5 variants.
— Am. J. Hyg., 70, 1959, p. 66-90.