

MANUEL DE TECHNIQUES DE LABORATOIRE POUR LE DIAGNOSTIC RAPIDE DES INFECTIONS VIRALES

JUNE D. ALMEIDA
*The Wellcome Research Laboratories
Beckenham, Angleterre*

D. W. BRADLEY
*Hepatitis Laboratories Division
CDC Bureau of Epidemiology
Phoenix, AZ, Etats-Unis d'Amérique*

J. E. MAYNARD
*Hepatitis Laboratory Division
CDC Bureau of Epidemiology
Phoenix, AZ, Etats-Unis d'Amérique*

A. VOLLER
*Nuffield Laboratories of Comparative Medicine
Institute of Zoology
Londres, Angleterre*

P. ATANASIU
*Institut Pasteur
Paris, France*

P. S. GARDNER
*Department of Virology
Royal Infirmary
Newcastle upon Tyne, Angleterre*

A. W. SCHUURS
*Groupe de Développement scientifique,
Organon
Oss, Pays-Bas*

R. H. YOLKEN
*Johns Hopkins University Medical School
Department of Pediatrics
Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique*



ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ
GENÈVE
1980

Publication offset No. 47

TABLE DES MATIERES

	Page
Introduction	5
1. Techniques de préparation des spécimens cliniques pour la coloration négative et l'immunomicroscopie électronique	7
2. Diagnostic par immunofluorescence indirecte sur des spécimens cliniques, notamment pour les virus respiratoires	12
3. L'immunofluorescence dans le diagnostic de la rage	19
4. La technique immuno-enzymatique pour l'identification de l'antigène rabique et le titrage des anticorps rabiques	22
5. Possibilités d'application de la technique de titrage avec immuno-adsorbant lié à une enzyme (ELISA) au diagnostic virologique	26
6. La recherche des rotavirus humains et de la toxine thermolabile d' <u>Escherichia coli</u> par la méthode ELISA	37
7. Titrage des anticorps anti-rotavirus par la méthode ELISA	43
8. Sérodiagnostic de l'hépatite virale aiguë de type A par dosage radio-immunologique de l'IgM	45
Bibliographie	52
Annexe 1 ELISA - matériel et méthodes	55



INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, l'Organisation mondiale de la Santé a accordé beaucoup d'attention au rôle essentiel, dans le traitement des maladies à virus, des techniques de laboratoire pour le diagnostic rapide des infections virales. Deux consultations OMS ont été tenues qui portaient sur cette question: à l'Institut Pasteur, à Paris, en décembre 1976 (1) et à la Ciba Foundation, à Londres, en décembre 1977 (2). Les participants aux deux consultations ont noté qu'il serait utile d'élaborer un manuel de techniques de laboratoire pour le diagnostic rapide des infections virales, destiné à la formation des étudiants. Les techniques choisies aux fins de la formation devraient être utilisables partout, notamment dans les pays où les techniques de culture tissulaire et les méthodes d'isolement des virus perfectionnées sont parfois inapplicables. Il est également souhaitable d'encourager l'utilisation de techniques permettant de résoudre les problèmes de diagnostic qui concernent particulièrement les pays en développement, par exemple dans le cas de la rage, de l'hépatite virale et des infections à rotavirus.

Les techniques de diagnostic rapide des infections virales peuvent être rangées dans quatre grandes catégories: la microscopie électronique; les techniques d'immunofluorescence, les techniques enzymatiques et les dosages radio-immunologiques. Bien que la microscopie électronique ne puisse être considérée comme un moyen de diagnostic généralisé dans les pays en développement, plusieurs d'entre eux possèdent néanmoins des centres équipés de microscopes électroniques. C'est pourquoi le présent manuel comporte un chapitre sur cette question, pour encourager l'utilisation de cette méthode partout où l'équipement existe. Les participants aux consultations susmentionnées sont convenus que, dans le cas de l'immunofluorescence, il serait bon d'encourager l'emploi de la méthode indirecte et, à l'exception de la rage, seule cette méthode a été considérée dans le présent manuel. En ce qui concerne les techniques enzymatiques, on a décrit le titrage avec immuno-adsorbant lié à une enzyme (ELISA) pour la détection des antigènes et anticorps, ainsi que la méthode de l'immunoperoxydase (phase non solide) pour le diagnostic de la rage. L'application de cette dernière technique à d'autres systèmes de virus a été évaluée lors d'une étude

collective (3). Le manuel met également l'accent sur la détection des rotavirus par la méthode ELISA, des virus des voies respiratoires par immunofluorescence et des anticorps IgM anti-hépatite virale A par dosage radio-immunologique. Le cas de l'hépatite B n'est pas abordé car cette question a été traitée de manière approfondie dans un ouvrage déjà publié par le Center for Disease Control, Etats-Unis d'Amérique, en collaboration avec l'OMS (4). Le dosage radio-immunologique fait peut-être aussi partie des techniques qui, comme la microscopie électronique, ne sont pas applicables à tous les pays, et il conviendrait de lui substituer d'autres méthodes pour le diagnostic de certaines infections virales, du moins lorsque celles-ci seront disponibles.

Bien que la détection des anticorps au moyen de l'ELISA, exception faite de l'IgM, ne puisse être strictement considérée comme une technique de diagnostic rapide, sa simplicité d'exécution et son excellente corrélation avec les épreuves sérologiques classiques justifient sa place dans le présent volume.

La pureté des réactifs utilisés dans toutes les techniques recommandées doit être garantie. Des organisations telles que les European and Pan-American Groups for Rapid Laboratory Viral Diagnosis, en collaboration avec l'OMS, publieront de temps à autre des listes de réactifs appropriés. La manipulation du matériel virologique dans des conditions de sécurité, bien qu'elle ne soit pas traitée dans ce bref recueil, est également de la plus haute importance; les chapitres 1 et 2 de Lennette et Schmidt (5), par exemple, en donnent une description utile.

1. TECHNIQUES DE PREPARATION DES SPECIMENS
CLINIQUES POUR LA COLORATION NEGATIVE
ET L'IMMUNOMICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Pratiquement tous les types de spécimens cliniques peuvent être examinés au microscope électronique au moyen de la technique de coloration négative, même s'il existe d'autres méthodes de préparation des échantillons. Certaines de ces techniques offrent l'avantage d'être très rapides, mais elles sont parfois moins sensibles. Les techniques les plus sensibles exigent généralement une centrifugation à grande vitesse.

Dans tous les cas, on utilise des grilles Carbon-Formvar (400 mailles). L'acide phosphotungstique utilisé pour la coloration est amené à pH 6 avec KOH à 1 mol/l. Ce pH donne généralement les meilleurs résultats, mais certains virus, par exemple les rhinovirus et le virus de la fièvre aphteuse, sont acidolabiles et devront être colorés par l'acide phosphotungstique à pH 8.

Méthode directe de manipulation des virus présents dans des liquides biologiques

Par liquide biologique, l'on entend le liquide vésiculaire, le liquide allantoïque et les suspensions de matières fécales.

On laisse absorber sur une grille une goutte du liquide contenant des virus, mais on ne la laisse pas sécher. La grille est ensuite lavée doucement avec quelques gouttes d'eau distillée. L'eau est remplacée par de l'acide phosphotungstique à la concentration de 20 g/l, amené à pH 6. Enfin, après avoir été séchée au moyen d'un petit morceau de papier filtre, la grille est prête à être examinée au microscope. Le temps de préparation est de 10 minutes environ. (Cette méthode est également utilisable pour préparer des virus contenus dans des fractions de gradients, mais dans ce cas, le temps de lavage sera sensiblement plus long, afin d'éliminer le chlorure de césium ou le saccharose.)

Méthode de manipulation des préparations de cultures tissulaires

Les virus se trouveront probablement tant dans le surnageant que dans le matériel cellulaire des cultures de tissus. Il convient donc d'examiner les deux éléments, en utilisant la méthode qui suit afin de perdre le minimum de temps. Prélever les cellules sur le verre ou le plastique en frottant avec une baguette munie d'un embout de caoutchouc. Puisque les cellules finiront par être lysées, il n'est pas nécessaire de prendre des précautions particulières. Les cellules et le surnageant sont transvasés dans un tube à centrifuger conique et centrifugés pendant 10 minutes à vitesse moyenne dans une centrifugeuse clinique de paillasse. Le surnageant est décanté et le culot cellulaire égoutté en plaçant le tube à l'envers dans un bécher contenant un matériau absorbant (Fig. 2). Le surnageant est alors transvasé dans un tube approprié et centrifugé pendant une heure à 12 000 g environ. Le surnageant est jeté et le culot à nouveau égoutté conformément à la méthode indiquée ci-dessus. Toutefois, pendant la centrifugation du surnageant de la culture de tissus, on peut examiner au microscope électronique le culot cellulaire. Au cas où un diagnostic pourrait être établi, il ne serait pas nécessaire d'examiner le culot du surnageant, d'où gain de temps.

Le culot cellulaire sera traité comme suit: au moyen d'une pipette Pasteur, ajouter une petite quantité d'eau distillée dans le tube pour reprendre le culot. Ajouter de l'eau jusqu'à ce que la suspension ne soit plus que légèrement trouble. Placer ensuite une goutte de cette suspension sur une lame de verre (Fig. 2) et ajouter une quantité égale d'acide phosphotungstique à 40 g/l, de pH 6. Déposer une goutte de cette suspension sur une grille et absorber l'excès de liquide au moyen d'un papier filtre (Fig. 2).

Surnageant de la culture de tissus

Essuyer le liquide en excès à l'intérieur du tube égoutté et introduire une petite quantité d'eau distillée. Reprendre le culot qui n'est pas toujours visible, colorer et préparer une grille comme indiqué précédemment.

Liquide allantoïque et urine

Utiliser soit la technique directe décrite plus haut, ou procéder conformément à la méthode donnée pour le surnageant de la culture de tissus.

Fèces

Préparer une suspension de 100 g/l de matières fécales dans de l'eau distillée et clarifier pendant 10 minutes dans une centrifugeuse de paillasse. Utiliser le surnageant pour la technique directe ou procéder conformément à la méthode indiquée pour le surnageant de la culture de tissus.

Sérum

Diluer le sérum dans une quantité égale de soluté salin tamponné au phosphate (PBS) et centrifuger pendant une heure à 15 000 g. Jeter le surnageant et reprendre le culot dans un volume de PBS équivalent au volume original. Centrifuger à nouveau pendant 1 heure à 15 000 g et jeter le surnageant. Egoutter le tube de la manière indiquée plus haut et procéder à la coloration négative conformément à la méthode déjà décrite.

Produits de lavage nasal

Diluer à un volume approprié au moyen de PBS et procéder de la manière indiquée pour le surnageant des cultures de tissus.

Tissus solides

Les tissus mous, tels que le cerveau et le foie, sont homogénéisés dans un homogénéiseur de verre et PTFE du type Tenbroek avec de l'eau distillée. La quantité d'eau peut varier, mais dans l'ensemble, une suspension de 100 g/l est généralement satisfaisante. Cette suspension homogénéisée peut alors être décantée et, comme dans le cas des cultures de tissus, on peut procéder à la coloration négative du culot et du surnageant.

Il est préférable de broyer les tissus durs, notamment

les lésions épidermiques telles que les verrues, dans un mortier, avec addition de sable d'argent pour une plus grande efficacité. Le broyat est ensuite décanté et le surnageant centrifugé pendant 1 heure à 12 000 g; le culot est utilisé pour la coloration négative selon la méthode habituelle.

Note: Lors de la préparation des échantillons pour une coloration négative, les structures massives ne présentent pas de problème, mais les protéines de masse moléculaire relative faible recouvriront et obscurciront les virus. C'est pourquoi il faut égoutter les tubes.

Immunomicroscopie électronique

Ici encore, toute une gamme de spécimens peuvent être utilisés. Le surnageant des cultures tissulaires, les matières fécales clarifiées, le liquide allantofique et le sérum donnent tous des résultats satisfaisants. Si l'échantillon comporte une grande quantité de matériel de fond, il est judicieux de procéder à une légère clarification.

Les volumes d'antigène viral appropriés à cette méthode sont de 2 ml environ, toutefois, selon les quantités disponibles, des volumes très faibles (0,2 ml) ou beaucoup plus grands (5,0 ml) sont également acceptables.

Si l'on utilise 2 ml d'antigène viral, il convient d'ajouter 0,2 ml d'immunsérum à une dilution appropriée. Cette dilution dépend du titre de l'immunsérum et de la quantité de virus présente dans la solution d'antigène. Si le titre de l'immunsérum n'est pas déterminé, on peut essayer 0,2 ml à une dilution de 1:10, et ajuster la dilution par la suite, lorsqu'on obtient un résultat.

L'immunsérum est ajouté à l'antigène viral et le tout soigneusement mélangé. On laisse ensuite le mélange réagir pendant un temps approprié. En cas d'urgence, cette période peut être limitée à 30 minutes à 37°C, mais il est bon de laisser reposer le mélange pendant 1 heure à la température du laboratoire ou pendant une nuit à 4°C. Une fois le temps de réaction écoulé, l'échantillon est centrifugé pendant 1 heure à 12 000 g et le culot traité comme précédemment.

Note: Le point le plus important en immunomicroscopie électronique, c'est l'appréciation des proportions relatives d'antigène et d'anticorps. Une trop grande quantité d'anticorps aura pour effet de recouvrir entièrement les particules individuelles, alors qu'une quantité trop faible n'entraînera pas la formation d'un complexe. Toutefois, lorsqu'on a évalué l'immunsérum, on s'apercevra qu'il existe une tolérance considérable autour du point équivalent pour qu'une aggrégation se produise.

Sécurité

Les spécimens utilisés en microscopie électronique contiennent encore des virus actifs et tous les matériels employés dans la préparation des grilles devraient être plongés dans l'hypochlorite (Fig. 1).

2. DIAGNOSTIC PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE
SUR DES SPECIMENS CLINIQUES,
NOTAMMENT POUR LES VIRUS RESPIRATOIRES

Seules sont décrites ici les méthodes utilisées pour l'examen de matériel clinique à la recherche d'une infection virale. Le succès des méthodes dépend de plusieurs facteurs, dont la préparation adéquate des échantillons et l'emploi de réactifs éprouvés dépourvus d'activité non spécifique.¹

Recherche directe du virus

Préparation des échantillons. Les sécrétions rhinopharyngées prélevées par pompage dans le rhinopharynx et aspirées dans un réservoir à mucus (Fig. 3) constituent les meilleurs échantillons pour l'étude d'une infection respiratoire virale. Les sécrétions doivent être rapidement transportées sur glace fondante jusqu'au laboratoire. On centrifuge les cellules à 350 g à une température de 4°C. Le surnageant est éliminé, et le culot cellulaire est utilisé pour un diagnostic rapide. On reprend le culot dans 3-4 ml de PBS en aspirant puis refoulant doucement au moyen d'une pipette Pasteur de gros calibre. On jette les particules épaisses de mucus qui ne se fragmentent pas. La suspension cellulaire est transvasée dans un tube à essai auquel on ajoute encore 4 ml de PBS. Le contenu est mélangé puis centrifugé à nouveau pendant 10 minutes à 350 g. Le culot est repris au PBS pour diluer les particules de mucus qui pourraient encore s'y trouver et pour obtenir un nombre suffisant de préparations sur lames permettant de rechercher plusieurs antigènes différents. Les lames peuvent être au préalable recouvertes de PTFE, en laissant à découvert des carrés sur lesquels sera placée la suspension cellulaire, mais on peut également délimiter des carrés sur des lames ordinaires. On étale régulièrement une goutte de suspension cellulaire sur chaque carré, et on la laisse sécher à l'air. Lorsqu'elle est sèche, la préparation est fixée à l'acétone pendant 10 minutes à 4°C.

¹ L'European Group for Rapid Laboratory Viral Diagnosis a évalué les réactifs Wellcome suivants et les estime satisfaisants.

Immunsérums: grippe A, virus respiratoire syncytial, herpèsvirus hominis, et rougeole.

Conjugués antispécies: antiglobuline de lapin, anti-globuline de bovin.

Les écouvillonnages de gorge (voir 6) sont beaucoup moins satisfaisants que les sécrétions rhinopharyngées. Les cellules présentes sur les écouvillons sont détachées doucement par élution au moyen de PBS versé à plusieurs reprises sur l'écouvillon avec une pipette. Les cellules étalées directement des écouvillons sur les lames sont impropres à cette technique. Les cellules détachées des écouvillons sont traitées de la même manière que celle décrite pour les sécrétions rhinopharyngées.

Les produits de raclage cutané sont prélevés à la base des vésicules. Les lésions croûteuses se prêtent moins au diagnostic par immunofluorescence. Les raclages oculaires peuvent être pratiqués sur la conjonctive, notamment dans la région des ulcères dendritiques. Les échantillons prélevés sur ces lésions sont fragmentés avec deux aiguilles à dissection dans une goutte de PBS déposée sur une lame. Lorsque le tissu est suffisamment dissocié pour que des cellules se trouvent en suspension dans le PBS, la suspension cellulaire est séchée à l'air puis fixée à l'acétone conformément à la méthode décrite ci-dessus.

Dans le cas des biopsies et du matériel nécropsique, les sécrétions prélevées dans l'appareil respiratoire sont traitées comme indiqué ci-dessus. La meilleure méthode pour examiner des tissus est celle des frottis par décalque. Des fragments de tissu de 2-3 mm² sont pressés entre deux lames de verre afin d'y laisser un calque. On fixe alors ces décalques à l'acétone après les avoir séchés, comme indiqué plus haut.

Réactifs. Le diagnostic par immunofluorescence exige des réactifs correctement éprouvés tant du point de vue de leur spécificité que de l'absence d'anticorps indésirables. Il est nécessaire d'effectuer des contrôles rigoureux, non seulement sur des cultures de tissus mais également sur du matériel clinique, afin de s'assurer de l'absence de toute réaction non spécifique. La plupart des immunosérums exigent une purification minutieuse pour éliminer les anticorps indésirables, ce qui implique généralement une absorption par des cellules de la culture utilisée pour cultiver le virus en vue de la préparation de l'immunosérum, ainsi que par des cellules d'origine humaine. La plupart des immunosérums sont produits par les utilisateurs eux-mêmes. Toutefois, certaines sociétés commerciales produisent maintenant

des immunosérums contre des virus particuliers, par exemple Wellcome Reagents fabrique un sérum bovin contre le virus respiratoire syncytial (RSV) et un sérum bovin anti-grippal A. Cette firme fabrique également un sérum de lapin anti-virus de l'herpès. Plusieurs laboratoires préparent leurs propres immunosérums en raison du petit nombre de préparations commerciales existantes. Parmi les virus qui ont été détectés dans du matériel clinique d'immunofluorescence indirecte figurent le virus RS, les virus grippaux A et B, les virus parainfluenzae de type 1, 2, 3, 4a et 4b, le groupe des adénovirus, le virus morbilleux, le virus ourlien, le virus rubéolique, l'herpès virus hominis, le virus varicello-zonateux et les cytomégalovirus (CMV).

On trouve des conjugués dans le commerce, mais ils exigent aussi une absorption avant d'être utilisés. Des conjugués anti-espèces correctement absorbés sont également disponibles (Wellcome).

Les titres optimum en anticorps fluorescents des immunosérums et des conjugués doivent être mesurés par titrage en cultures tissulaires appropriées inoculées avec le virus ainsi que sur des échantillons cliniques. On peut exécuter tous ces titrages en diluant le conjugué anti-espèce dans une solution à 0,1 g/l de noir de naphthalène dans du PBS. Cette méthode est particulièrement utile pour réduire la fluorescence propre des cellules humaines contenues dans le matériel clinique.

Source d'éclairage et microscope. Il faut une source lumineuse de forte intensité émettant dans l'ultra-violet et le violet-bleu. A cet effet, on emploie généralement des lampes à vapeurs de mercure de type HBO 200. Lorsque seule une fluorescence bleue est nécessaire, on peut utiliser une lampe à quartz iodé munie de filtres interférentiels.

Tant la lumière transmise que la lumière incidente conviennent au microscope à fluorescence; toutefois, la mise au point de filtres interférentiels fiables a généralisé l'éclairage en lumière incidente. Chaque type de microscope et chaque méthode d'éclairage exigent leur propre système de filtres.

Techniques de coloration. Les lames, comportant généralement jusqu'à trois préparations cellulaires par lame, sont traitées par plusieurs immunosérums appropriés. Chez un enfant atteint de croup, par exemple, on recherchera les virus parainfluenzae de type 1, 2, 3, 4a et 4b, ainsi que les virus grippaux A et B et le virus RS, lorsque ceux-ci sont épidémiques. Les préparations cellulaires de chaque lame sont recouvertes d'immunosérum à une dilution optimale prédéterminée et sont incubées en atmosphère humide pendant 30 minutes à 37°C. On lave ensuite doucement les lames qui sont alors plongées dans 3 bains successifs de PBS, d'une durée de 10 minutes chacun. Les lames sont mises à sécher puis un sérum anti-espèce approprié conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine est ajouté à chaque préparation; les lames ainsi colorées sont à nouveau incubées en atmosphère humide pendant 30 minutes à 37°C. La méthode de rinçage est exactement la même que celle qui est décrite plus haut, mais on procède en outre à un dernier rinçage à l'eau distillée pour éliminer les dépôts cristallins provenant du PBS, qui auraient pu se former pendant le séchage de la préparation. La lame est séchée à l'air puis examinée au moyen d'un objectif à immersion. Il est inutile de monter la préparation ou de la recouvrir d'une lamelle.

Témoins. On utilise généralement comme témoins plusieurs immunosérums provenant de lapins différents. Il n'existe pas de véritable témoin négatif pour un spécimen de matériel clinique. Toutefois, le sérum prélevé avant l'incubation de l'animal utilisé pour préparer l'immunosérum constitue un témoin complémentaire utile en cas de doute. La meilleure façon de distinguer une fluorescence positive se présente comme suit:

1. Fluorescence intracellulaire.
2. La distribution de la fluorescence dans la cellule doit être caractéristique d'un virus particulier, conformément à l'expérience acquise.
3. La fluorescence doit être de couleur vert-pomme. Tout écart à cette coloration doit être considéré comme douteux.

Lorsqu'on introduit une technique nouvelle, il ne faut pas éliminer les techniques classiques avant d'avoir procédé à un nombre suffisant de comparaisons (au moins 100) entre l'épreuve d'immunofluorescence positive et la technique

classique. L'isolement du virus est la technique classique la plus couramment utilisée. Il va sans dire que le degré de corrélation entre les deux techniques devra être élevé: de l'ordre de 95 à 100%.

Contrôle de la qualité des réactifs.

(a) Les cellules infectées et les cellules témoins doivent être soumises à une épreuve pour déterminer la dilution optimale de l'immunsérum permettant de détecter l'antigène. S'il s'agit d'un conjugué anti-espèce approprié et déjà standardisé, la dilution de l'immunsérum sera quatre fois plus élevée au moins que celle qui révèle une fluorescence non spécifique dans des cellules non infectées. Parmi les cultures cellulaires témoins devraient figurer une lignée continue humaine, une lignée continue de rein de singe, une souche de cellules diploïdes et une lignée primaire de rein de singe.

(b) Un titrage limité pour évaluation finale doit être effectué sur du matériel clinique positif approprié au virus recherché.

(c) Les immunsérums devront être évalués, en utilisant leurs dilutions optimales, sur des sécrétions pharyngées négatives, et, si possible, sur d'autres spécimens cliniques humains négatifs.

(d) Il faudra éprouver les immunsérums sur des cultures cellulaires auxquelles une collection représentative de virus aura été inoculée, par exemple les virus RS et parainfluenzae 1, 2, 3, 4a et 4b, le virus ourlien, les virus grippaux A et B, le virus morbilleux, le virus de l'herpès, le CMV et deux entérovirus au moins. Ces immunsérums utilisés à leurs dilutions optimales ne devraient présenter aucune activité non spécifique lorsqu'ils sont mis en présence des antigènes viraux hétérologues.

Contrôle de la qualité des conjugués anti-espèces, par exemple antiglobuline de lapin ou antiglobuline bovine.

(a) Des dilutions d'antiglobuline conjuguée avec un immunsérum approprié seront éprouvées sur des cultures de tissus positives et des spécimens humains positifs, afin

de déterminer la dilution optimale à employer. Une dilution optimale préliminaire peut être obtenue sur une culture de tissus, mais elle devra être modifiée pour une utilisation définitive sur du matériel prélevé sur le malade lui-même.

(b) Les dilutions optimales sont alors testées sur les lignées cellulaires susceptibles d'être utilisées dans le laboratoire (dont les lignées indiquées plus haut pour les immunosérums), afin de détecter toutes réactions non spécifiques éventuelles.

(c) Les antiglobulines seront alors éprouvées, à la dilution optimale, sur du matériel humain négatif, notamment des sécrétions rhinopharyngées, du matériel pulmonaire et du matériel provenant de biopsies.

Ces critères ne s'appliquent que dans les conditions du système d'épreuve et les utilisateurs des réactifs auront intérêt à employer la technique de coloration qui comprend une contre-coloration, comme suggéré plus haut.

On trouvera des instructions détaillées concernant ces techniques dans la littérature (6).

Détection des anticorps IgM au moyen des techniques d'immunofluorescence

La lignée cellulaire appropriée est infectée par le virus. Des lames peuvent être préparées avec des cellules infectées qui sont fixées pendant 5 minutes à l'acétone; elles sont alors prêtes à l'emploi. On sensibilise pendant 3 heures à 37°C les cellules fixées par des dilutions de sérum de la phase aiguë prélevé sur un malade. On lave ensuite les lames à trois reprises pendant 10 minutes (30 minutes en tout), comme indiqué plus haut, puis on les colore par une IgM anti-humaine pendant 30 minutes à 37°C, on les lave à nouveau et on les examine au moyen d'un objectif à immersion. Il est possible d'utiliser des cellules non fixées ("fluorescence de membrane"), en déposant dans chaque alvéole d'une plaque de microtitrage 0,02 ml de sérum dilué, additionné de 0,015 ml d'une suspension cellulaire infectée par le virus. La plaque est incubée pendant 1 heure à la température ambiante. On élimine alors l'excès de sérum en procédant à trois lavages au soluté salin de

Hanks au moyen d'une centrifugeuse de plaques tournant à 100 g. Placer ensuite 0,015 ml d'IgM anti-humainé dans chaque alvéole, et incubé les plaques pendant 1 heure à la température ambiante; la méthode de lavage est la même que celle décrite plus haut. Puis les cellules sont reprises dans 0,03 ml de soluté salin de Hanks et déposées sur des lames couvertes d'une lamelle. Les lames sont scellées à la cire puis examinées. Il peut arriver que l'IgM spécifique soit masquée par de grandes quantités d'IgG spécifique. Toutefois, si le diagnostic est effectué rapidement au début de la maladie, ce problème ne devrait pas se poser, car les titres d'IgG ne seront pas encore élevés. Parmi les nombreuses méthodes de séparation de l'IgM, on peut citer l'absorption par Staphylococcus aureus Cowan de type 1, la coloration de fluorescence de l'IgM spécifique en gradients de saccharose, la filtration sur gel en couche mince et la chromatographie d'affinité.

Les résultats peuvent également être influencés par le facteur rhumatoïde. Si c'est le cas, on peut l'éliminer en procédant à une absorption par des complexes d'IgG agrégées.

3. L'IMMUNOFLUORESCENCE DANS LE DIAGNOSTIC DE LA RAGE

La rage est une maladie dont le temps d'incubation et le traitement sont longs. Il est donc nécessaire de procéder à un examen rapide et spécifique du matériel suspect, afin que le traitement puisse être entrepris et poursuivi.

La technique des anticorps fluorescents (AF), mise au point en 1958 (7), est l'une des meilleures techniques existantes, en raison de sa spécificité et de sa rapidité d'exécution. Elle a, dans une large mesure, remplacé le diagnostic par inoculation d'un animal. Elle est également sensible sous sa forme directe que sous sa forme indirecte.

La technique FA directe a été appliquée avec succès au titrage des anticorps neutralisants sur culture de tissus, les résultats étant comparables à ceux qui sont obtenus par la technique de neutralisation chez la souris (8).

Matériel et méthodes

Immunsérums. On sait que le virus rabique contient deux antigènes principaux: un antigène interne, la nucléocapside, et un antigène périphérique, la glycoprotéine. Dans le virus rabique, ce sont les anticorps dirigés contre la nucléocapside qui sont sensibles à la coloration immunochimique (fluorescence et immunoperoxydase), à la fixation du complément et à la précipitation.

On peut utiliser deux types d'immunsérums: un immunosérum de cheval possédant un titre neutralisant et anti-nucléocapside élevé, préparé contre la souche virale Pasteur produite en culture cellulaire; et un immunosérum de lapin contre une préparation pure de nucléocapside.

Purification des anticorps. On peut employer deux méthodes: (1) purification à l'aide d'un immunoabsorbant (cette méthode a été décrite en détail) (9); et (2) chromatographie sur QAE Sephadex 50, qui permet d'extraire du sérum anti-nucléocapside l'IgG sous forme pure (10).

Conjugaison par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Après une dialyse de 5 heures contre tampon carbonate, de pH 9, les préparations d'IgG sont conjuguées

par le FITC, à la concentration de 1 mg de FITC pour 100 mg de protéine.

Préparation et examen des spécimens. Le matériel provenant d'animaux soupçonnés d'être atteints de la rage, composé de coupes à la congélation et de frottis-décalques de tissu cérébral, est examiné comme suit.

Pour effectuer des coupes à la congélation, les organes des animaux suspects sont prélevés en conditions aseptiques, coupés rapidement en fragments de 1 mm³, et congelés sur carboglace. Les fragments sont placés sur un support et maintenus à -20°C; le lendemain ils sont sectionnés en coupes de 0,004 mm d'épaisseur. Les préparations sont fixées à l'acétone pendant 10 minutes et colorées au moyen de la technique FA.

Les frottis sont préparés à partir de l'hippocampe (corne d'Ammon) et du bulbe rachidien des animaux suspects, un frottis de chacune de ces régions étant étalé sur chaque lame. Les lames sont ensuite séchées, puis stérilisées aux ultra-violets pendant 5 minutes et fixées à froid à l'acétone pendant 10 minutes. L'un des frottis de chacune des lames est alors coloré par une globuline antirabique marquée et une suspension à 200 g/l de cerveau de souris atteinte de rage. L'autre frottis est coloré par une globuline antirabique marquée et une suspension à 200 g/l de cerveau de souris normale. Les lames sont conservées en atmosphère humide pendant 30 minutes à 37°C, avant d'être lavées pendant 10 minutes avec un soluté salin tamponné (pH 7,2), puis pendant 2 minutes à l'eau distillée, et enfin, pendant une minute encore à l'eau distillée. Après un nouveau séchage, les lames sont traitées par de l'alcool polyvinylique ou du glycérol à 100 g/l pendant 2 heures à 37°C, montées et immédiatement examinées au microscope à fluorescence. Une absence de fluorescence dans la préparation soumise au cerveau de souris atteinte de rage indique une réaction spécifique. Dans le cas de la préparation exposée au cerveau de souris normale, une fluorescence spécifique indique une réaction positive, et une absence de fluorescence, une réaction négative.

Conclusions

Il est possible d'obtenir une bonne purification et un

titre élevé d'IgG conjuguée au FITC par chromatographie sur colonne de QAE Sephadex 50.

En outre, l'utilisation d'immunsérums contre les nucléocapsides virales purifiées permettent d'obtenir des conjugués ayant des titres très élevés.

La technique FA directe est extrêmement sensible pour les coupes à la congélation ou les frottis.

En tant que technique de diagnostic des antigènes rabiques, l'immunofluorescence satisfait à tous les critères de sensibilité et de spécificité.

L'utilisation, pour la technique FA, d'un immunsérum contre l'antigène nucléocapsidial du virus rabique purifié sur colonne de QAE Sephadex 50, est très commode, en raison de sa grande sensibilité, de son absence de fluorescence de fond et de son coût peu élevé.

4. LA TECHNIQUE IMMUNOCENZYMATIQUE POUR L'IDENTIFICATION DE L'ANTIGÈNE RABIQUE ET LE TITRAGE DES ANTICORPS RABIQES

Les antigènes viraux sont mis en évidence par des anticorps marqués avec différentes substances facilement révélables. Ce fut d'abord la fluorescéine en microscopie à ultra-violets et la ferritine en microscopie électronique. Ensuite, la possibilité d'utiliser des enzymes couplées aux anticorps, fut appliquée pour la mise en évidence des antigènes et pour le titrage des anticorps dans un nombre important d'infections parasitaires, bactériennes et virales. Les enzymes les plus utilisées sont la phosphatase alcaline, la glucose-oxydase et la peroxydase. La peroxydase, révélable en microscopie optique et électronique, est la plus utilisée en virologie.

La peroxydase (PM 40.000) peut être couplée aux anticorps à l'aide du glutaraldéhyde ou du periodate sans que les fonctions anticorps et peroxydasique soient altérées (11, 12). Le complexe antigène-anticorps marqué à la peroxydase est révélé par une réaction colorée due à la peroxydase en présence d'eau oxygénée et de benzidine ou d'0-dianisidine.

L'identification de l'antigène rabique

On utilise des immunoglobulines antirabiques de lapin couplées à la peroxydase, provenant des immunosérums obtenus avec les antigènes nucléocapsidiques ou glycoprotéiniques. Ceci pour la technique directe. Pour la technique indirecte, on utilise des IgG anti-lapin couplées à la peroxydase ou des globulines anti-IgG et anti-IgM humaines, obtenues sur mouton et couplées à la peroxydase.

Technique directe. Des lames histologiques possédant deux impressions fines de cerveau rabique (de préférence de la région de la Corne d'Ammon), sont fixées à l'acétone refroidie à -20°C. L'impression près de l'étiquette recevra une goutte d'une dilution de conjugué antinucléocapside rabique marquée à la peroxydase dans du cerveau normal de souris à 100 g/l; l'autre impression recevra une solution tamponnée de cerveau normal de souris à 100 g/l. Les lames sont incubées pendant 1 heure à 37°C, lavées pendant dix minutes dans du tampon phosphate. Elles sont alors prêtes

à la révélation à la benzidine : traitement par 5 mg de diamino-benzidine dissous dans 10 ml de tampon Tris HCL pH 7,4. On ajoute à cette solution une goutte d'eau oxygénée à 30 volumes. Une goutte de ce réactif est déposée sur chaque empreinte, et, après 5 min à la température du laboratoire, on lave à l'eau distillée. On examine en microscopie optique à différents grossissements et en dernier lieu à l'immersion.

Les inclusions petites et grandes colorées en brun rencontrées près de l'étiquette, représentent l'antigène spécifique. Elles sont absentes dans le témoin (13).

Technique indirecte. Sur le même type d'impression on ajoute côté étiquette une dilution convenable de sérum antirabique (antinucléocapside de préférence lapin), de l'autre côté un sérum normal lapin. On laisse 30 min à 37°C. On lave avec une solution tampon pH 7,2. On ajoute ensuite les globulines anti-lapin marquées à la peroxydase à la dilution indiquée. Après 30 min à 37°C, on lave et on ajoute le substrat (eau-oxygénée-benzidine) en suivant les proportions et le temps de la technique directe. La lecture des résultats est identique à la technique directe. Petites et grosses inclusions brunes représentent l'antigène rabique. Le témoin est entièrement négatif.

Titration des anticorps rabiques

L'introduction de la technique immunoenzymatique (IE) en vue de titrer des substances solubles a été développée indépendamment (14). Cette technique a offert la possibilité de suivre la dynamique d'apparition des anticorps rabiques chez les sujets vaccinés préventivement contre la rage, ainsi que chez des sujets malades de rage, sans avoir subi un traitement antirabique. On identifie aisément les IgM et les IgG spécifiques chez ces derniers sujets.

Principe. On fixe l'antigène rabique sur des tubes en polystyrène qui reçoivent, après incubation, l'anti-sérum correspondant suivi d'une préparation anti-immunoglobulines marquées par une enzyme. (Si on utilise des plaques à microtitrage, on disposera 0,3 ml d'antigène dans chaque capsule). La quantité d'enzyme restant dans

le tube (ou la capsule) après lavage fournit la mesure de la quantité d'anticorps spécifiques présents dans le sérum.

Produits. On utilise comme antigène la souche de virus Pasteur adaptée à la culture de cellules BHK₂₁C₁₃ dont le titre est d'environ 10⁸ unités formatrices de plages (UFP) par millilitre. Ce virus, qu'on multiplie en présence d'albumine bovine, est concentré 25 fois par précipitation à l'acétate de zinc. Le précipité dissous dans du tampon Tris-Edta est centrifugé à 60 000 g pendant 150 min. Le culot est repris dans du tampon carbonate à 0,05 mol/l pH 9,6 avec du NaN₃ à 0,2 g/l. Ceci constitue l'antigène de départ.

On utilise des tubes en polystyrène de 50x11 mm ou des plaques à microtitrage (Greiner, type M-129-A) faciles à trouver dans le commerce et des immunoglobulines anti-humaines obtenues sur mouton et conjugués à la peroxydase.

On utilise deux sérums témoins humains: le sérum positif qui est un mélange de plusieurs sérums ayant un bon titre (5 à 10 UI) en séroneutralisation sur souris et d'un sérum négatif également constitué d'un mélange de sérums (titre en séroneutralisation: < 1/5).

Méthode. L'antigène est utilisé à la dilution optimum (entre 1:100 et 1:200) dans 1 ml de tampon carbonate. Cet antigène reste en contact avec le tube durant 3 h à 37°C. Par la suite, le tout reste à +4°C jusqu'au lendemain, moment de l'exécution de la réaction. (Si on utilise une plaque à microtitrage, on disposera dans chaque capsule 0,3 ml d'antigène en milieu tamponné). On lave chaque tube ou plaque 5 fois avec 5 ml de PBS contenant 0,5 g/l Tween 20. On utilisera ce mélange pour tous les lavages.

Tous les sérums à éprouver et les sérums témoins sont dilués à 1:200 dans du PBS contenant 0,5 g/l d'albumine bovine. On répartit le mélange à raison de 1 ml par tube ou de 0,3 ml par capsule puis on incube 1 h à 37°C; on lave ensuite 5 fois. On ajoute ensuite 1 ml d'une dilution (même diluant) au 1:500 de globulines anti-IgG humaine conjuguées à la peroxydase (ou 0,3 ml dans chaque capsule). Après un contact d'une heure à 37°C et lavage, on détermine la quantité d'enzyme accrochée au tube par la réaction avec un substrat spécifique. Celui-ci est préparé extemporané-

ment: 1 ml de tampon phosphate à 1 mol/l (pH 6), 1 ml d'une solution à 10 g/l d'o-dianisidine dans du méthanol et 0,1 ml de H₂O₂ à 30 vol. et le tout complété à 100 ml par de l'eau distillée. Chaque tube reçoit 2,5 ml de substrat qu'on laisse en contact pendant 1 h à 37°C. On arrête la réaction avec une goutte de HCl à 5 mol/l et on fait la lecture en densité optique (DO), au spectrophotomètre à 403 nm. Les résultats sont exprimés par la différence de DO à 403 nm entre le sérum à tester et le témoin négatif.

Les avantages de ces techniques immunoenzymatiques sont leur stabilité, la facilité des mesures, beaucoup plus sensibles que pour la séroneutralisation, surtout chez des sujets malades d'encéphalite rabique, sans traitement. Les IgM spécifiques se trouvent dans le sérum aux tous premiers jours de la maladie, ce qui facilite énormément le diagnostic de laboratoire.

5. POSSIBILITES D'APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE TITRAGE
AVEC IMMUNO-ADSORBANT LIE A UNE ENZYME (ELISA)
AU DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Le titrage avec immuno-adsorbant (ELISA) semble ouvrir des perspectives prometteuses pour le diagnostic (14, 16, 17). Il convient toutefois de noter que la plupart des applications de la méthode ELISA en virologie en sont encore à la phase de recherche et développement.

La méthode ELISA semble être la technique évidente à employer pour détecter les anticorps, ce qui peut être réalisé au moyen de la "méthode indirecte" (Fig. 4). Les antigènes, p. ex. les virus ou leurs produits, peuvent être mesurés au moyen de la méthode à double couche d'anticorps "en sandwich" (Fig. 5).

En principe, ces méthodes sont simples, mais de nombreuses variables peuvent affecter les résultats. Certaines d'entre elles sont examinées ci-après.

Supports

On peut utiliser des tubes, des disques ou des perles. Les plaques à hémagglutination jetables sont particulièrement pratiques (voir Annexe 1). Il est essentiel d'employer un support en phase solide à forte capacité de fixation et de comportement constant, que ce soit dans un même lot ou d'un lot à un autre. On peut observer des variations considérables au sein d'un même lot ou entre différents lots de production de tous les tubes, perles et plaques de plastique utilisés, par exemple en polystyrène, ou en chlorures de polyvinyle. Dans les épreuves fondées sur une adsorption passive du réactif, la composition chimique et les caractéristiques de la surface sont particulièrement importantes. En outre, les traitements spéciaux, par exemple la radiostérilisation, peuvent influencer la réactivité de la phase solide. Par conséquent, il conviendrait de contrôler tous les lots de matériel avant de les utiliser comme phase solide. Ce contrôle devrait également comporter la détermination des variations à l'intérieur d'un même lot.

On peut contrôler un échantillon représentatif d'un lot de perles, tubes ou microplaques en procédant comme

suit:

1. Sensibiliser la surface au moyen d'une Ig humaine étalon.
2. Faire réagir avec une Ig anti-humaine marquée par une enzyme.
3. Ajouter le substrat et lire les résultats après un temps d'incubation approprié.

Une telle méthode peut indiquer la conformité et la variabilité du matériau constituant la phase solide ainsi que ses caractéristiques d'absorption. On peut considérer comme acceptable un écart-type de 0,05 sur une valeur de densité optique de 1,0. Bien que les résultats obtenus en sensibilisant la surface au moyen d'un Ig humaine semblent assez représentatifs pour plusieurs substances (antigènes ou anticorps), il est également possible de choisir, comme étalon de laboratoire, une autre substance à une concentration prédéterminée.

Pour la détection des anticorps, le support doit être sensibilisé par un antigène en solution dans un tampon approprié (voir Annexe 1). Les antigènes sont généralement fixés à la phase solide par adsorption passive. Dans certains cas, le couplage par liaison covalente peut être avantageux. Divers antigènes disponibles dans le commerce se sont montrés satisfaisants. Toutefois, les antigènes viraux préparés et standardisés pour d'autres épreuves, faisant intervenir des anticorps, telles que l'épreuve de fixation du complément ou d'agglutination passive, peuvent ne pas convenir à la méthode ELISA. Ces antigènes sont fréquemment dilués dans des solutions d'autres protéines, par exemple l'albumine, ou sont préparés pour une activité anti-complémentaire, ce qui affecte inévitablement la réactivité de l'ELISA. Lorsque l'antigène viral pertinent est connu et qu'il peut être purifié de manière pratique et économique, il conviendrait de l'utiliser en lieu et place de préparations brutes. Toutefois, la plupart des antigènes viraux sont des extraits bruts et ils ne peuvent pas toujours être caractérisés de manière satisfaisante. La seule façon commode de les standardiser consiste à procéder à des titrages ELISA en damier avec un sérum étalon au moins contenant l'anticorps dirigé contre l'antigène en question, dans des conditions et avec des conjugués anti-immunoglobuline bien définis. Par la suite, ces antigènes devront être

essayés sur une batterie de sérums afin de pouvoir détecter une fausse réactivité non spécifique. Cette batterie de sérums devrait être composée d'échantillons fortement positifs, faiblement positifs et négatifs, et d'échantillons reconnus sans problèmes dans d'autres épreuves sérologiques. L'emploi d'un "antigène témoin", c'est-à-dire d'un matériel préparé de la même façon que l'antigène viral, mais à partir de matériel non infecté, est souvent nécessaire. On ne peut conclure à une réaction réellement positive que lorsqu'on observe des différences suffisamment grandes entre les réactions des antigènes viraux et témoins.

La conformité des immunsérums pour les préparations d'anticorps de la phase solide utilisé pour le titrage des antigènes dépendra de leur spécificité et de leur titre. Les normes de spécificité ne semblent pas être très différentes de celles qui sont appliquées aux autres systèmes de titrage immunologique. Si le titre de l'immunsérum est suffisamment élevé, on peut employer, pour la sensibilisation, une fraction immunoglobulinémique brute. La sensibilité doit être déterminée par une série de dilutions d'au moins une préparation-témoin positive. Il conviendrait d'évaluer la sensibilité et la spécificité au moyen d'une batterie d'échantillons d'épreuve positifs, faiblement positifs et négatifs.

En général, la qualité de l'antigène ou de l'anticorps de la phase solide devrait être telle que la différence de réaction entre la liaison spécifique et la liaison non spécifique soit maximale. Cette différence doit s'exprimer sous la forme d'un rapport et se situer dans la zone de précision de l'échelle de l'instrument, par exemple le spectrophotomètre, utilisé pour mesurer la réaction.

Echantillon à titrer

La dilution optimale des échantillons à titrer doit être déterminée par titrage en damier au moyen de sérums de référence positifs, faiblement positifs et négatifs.

On utilise, pour les épreuves de routine, la dilution des échantillons donnant la plus grande différence de réaction par rapport aux échantillons négatifs. On peut exprimer cette différence sous forme de rapport, mais il faut

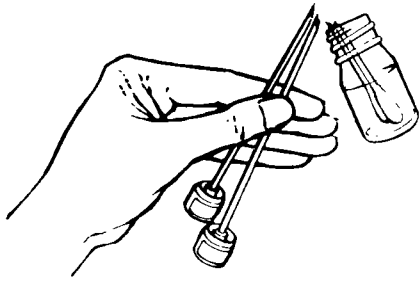


Fig. 1 Matériel nécessaire à l'exécution d'une coloration négative



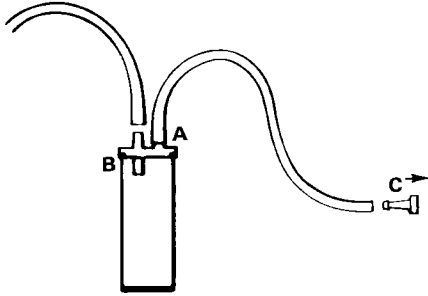
Fig. 2 Méthode de manipulation des spécimens et des grilles dans la technique de coloration négative

Fig. 3 Transport des écouvillonnages de gorge; aspiration et transport des sécrétions rhinopharyngées



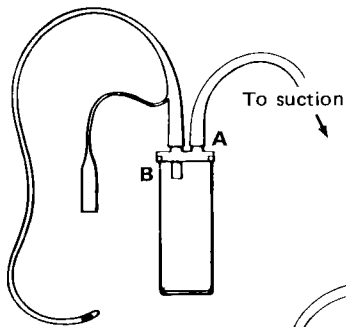
Transport des écouvillonnages de gorge

Les écouvillons sont placés dans la même bouteille de solution de Hanks

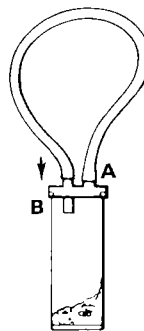


Appareil pour l'aspiration des sécrétions rhinopharyngées

i) Retirer et jeter le tube fixé sur l'embout B et le bouchon C



ii) Fixer un tube rhinogastrique de diamètre 8 à l'embout B et relier le tube A à la pompe aspirante



Transport des sécrétions rhinopharyngées

Retirer et jeter le tube rhinogastrique, détacher l'extrémité du tube de la pompe aspirante et la fixer à l'embout B

WHO 80388

Fig. 4 Méthode ELISA indirecte pour le titrage des anticorps

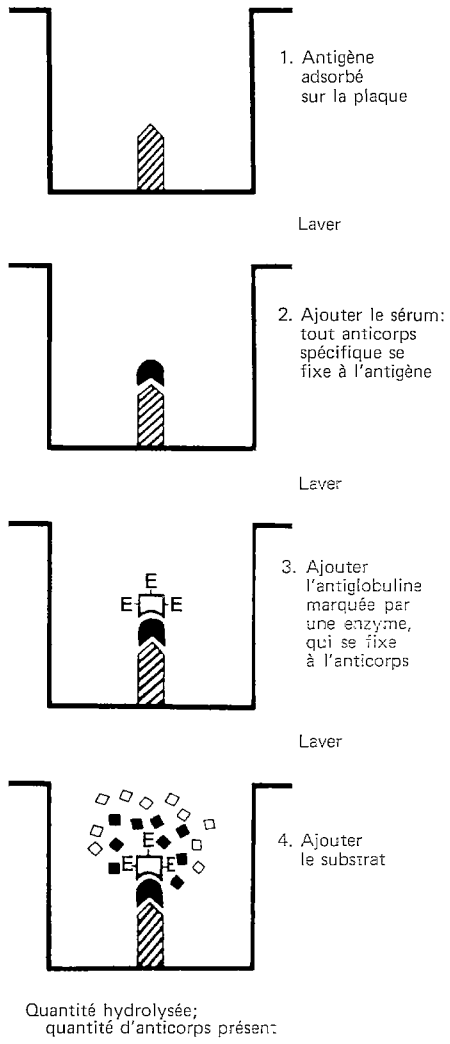
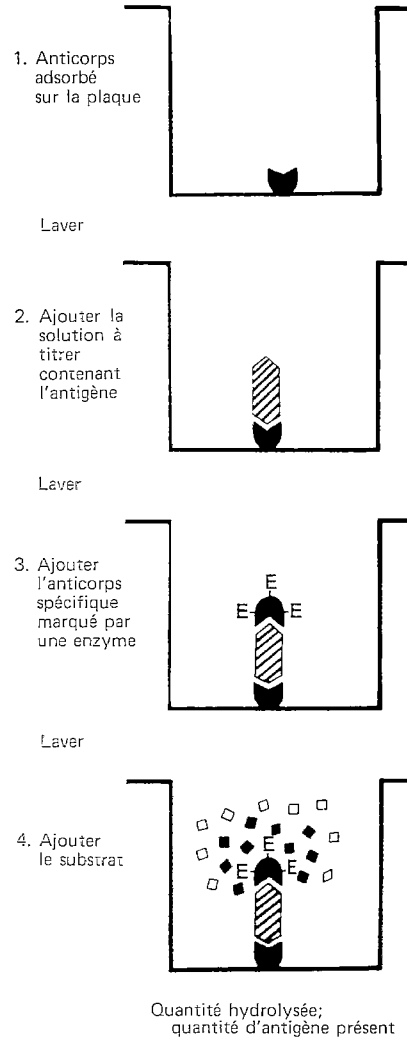
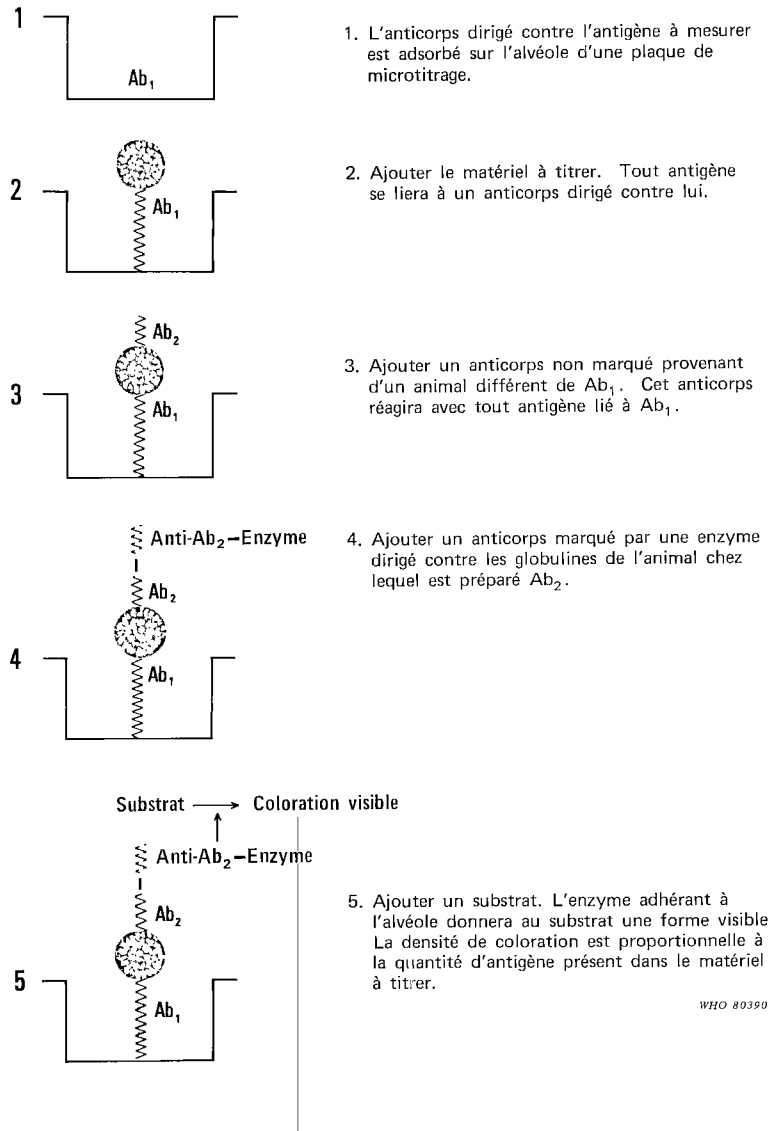


Fig. 5 Méthode ELISA à double couche d'anticorps ("sandwich") pour le titrage des antigènes ou des virus



ASTROS Orléans

Fig. 6 Méthode ELISA indirecte pour le titrage des antigènes



qu'elle soit également en rapport avec la longueur totale de l'échelle de l'instrument utilisé pour mesurer la réaction. Lorsque la détermination est faite à l'oeil nu, il convient de rechercher le contraste optimum entre l'échantillon (faiblement) positif et l'échantillon négatif.

Il peut s'avérer nécessaire, dans certains cas, de titrer les échantillons à deux dilutions différentes, ou davantage.

Avant d'effectuer l'épreuve proprement dite, il faut parfois traiter les spécimens cliniques, tels que les matières fécales et les produits de raclage de la peau. Pour parfaire ce procédé, il convient d'effectuer des titrages en damier, comme indiqué plus haut. Il faut également évaluer l'effet de ce traitement sur la spécificité.

Conjugués

Des immunsérums possédant une spécificité et un titre élevés sont nécessaires à la préparation des conjugués. Il est préférable d'obtenir de grands lots d'immunsérums et de ne conjuguer que les quantités nécessaires pour chaque épreuve. Tout passage d'un lot à un autre doit être accompagné d'une évaluation de la sensibilité et de la spécificité.

Les immunsérums contre les immunoglobulines qui seront utilisés pour le titrage des anticorps devront être dépourvus d'anticorps à l'égard des antigènes viraux et témoins de la phase solide. D'autre part, il est souvent préférable d'employer des immunsérums spécifiques d'une classe d'immunoglobuline (p. ex. anti-IgG, anti-IgM). Il convient de contrôler leur spécificité dans chaque nouveau système de titrage.

Il faudra vérifier avec soin la spécificité des immunsérums contre les antigènes viraux, par exemple avec des préparations d'antigènes de virus apparentés et avec des antigènes témoins.

Il est souhaitable que le premier ou le second anticorps marqué par l'enzyme soit dépourvu tant d'anticorps non marqué que d'enzyme non conjugué. L'enzyme conjugué doit avoir conservé une grande partie de son activité enzy-

matique, et même, de préférence, toute cette activité. L'anticorps marqué doit avoir conservé une grande partie de son affinité d'origine, et même, de préférence, la totalité de celle-ci. Les exigences du système d'épreuve utilisé détermineront dans quelle mesure il faudra s'efforcer de remplir ces critères idéaux. L'importance des caractéristiques physico-chimiques, telles que la masse moléculaire relative, demeure incertaine en ce qui concerne l'applicabilité des conjugués aux épreuves immunologiques.

Plusieurs enzymes peuvent être utilisées dans ce système (voir Annexe 1). Jusqu'ici, ce sont la peroxydase, la phosphatase alcaline et la bêta-galactosidase qui ont été le plus fréquemment employées.

On peut évaluer comme suit les conjugués anti-immunoglobulines:

(a) sur des supports solides sensibilisés au moyen de l'immunoglobuline pertinente (témoin positif);

(b) lorsque la spécificité de classe est importante, sur un support solide sensibilisé au moyen d'autres classes d'immunoglobulines (témoins négatifs);

(c) sur un support solide sensibilisé au moyen d'antigène viral et d'antigène témoin (témoins négatifs);

(d) au moyen de sérums de référence positifs dans le système d'épreuve dans lequel le conjugué sera employé par la suite (témoins positifs); et

(e) au moyen de sérums de référence négatifs dans le système d'épreuve dans lequel le conjugué sera employé par la suite (témoins négatifs).

On peut évaluer comme suit les conjugués antivirux:

(a) au moyen d'échantillons de référence positifs dans le système d'épreuve dans lequel le conjugué sera employé par la suite (témoins positifs); et

(b) au moyen d'échantillons de référence négatifs dans le système d'épreuve dans lequel le conjugué sera employé par la suite (témoins négatifs).

Il conviendrait que la concentration optimale du conjugué soit telle qu'elle assure une différence de réaction optimale entre les échantillons positifs et négatifs.

Substrats

Les substrats enzymatiques devraient être peu coûteux et sans danger et devraient produire une modification de coloration facilement observable à la dégradation (voir Annexe 1). Le phosphate de nitro-4 phényle est approprié à la phosphatase alcaline et l'on a beaucoup utilisé l'acide amino-5 salicylique pour la peroxydase, toutefois, il conviendrait de lui substituer l'ortho-phénylènediamine avec H_2O_2 .

Résultats

On peut évaluer les résultats à l'oeil nu, les échantillons qui présentent une coloration évidente étant alors considérés comme positifs. Cette coloration peut être mesurée si l'on effectue des dilutions en série des sérums à titrer.

Une mesure plus précise demande un spectrophotomètre simple. Avec ces instruments on peut se contenter de quantités très faibles de réactifs (0,2 ml), à condition d'utiliser des micro-cuves.

Conditions d'épreuve

La spécificité immunologique du titrage immuno-enzymatique, comme celle des autres dosages immunologiques, est fondée sur la spécificité des réactifs utilisés dans la combinaison finale de l'épreuve. Toutefois, même si la qualité de chacun des réactifs est satisfaisante, on ne peut présupposer que la combinaison des réactifs sera suffisamment spécifique, précise et sensible pour un objectif particulier. Par conséquent, les mesures de normalisation et de contrôle de la qualité devront être précisément choisies en vue de la combinaison finale de réactifs. Elles devront comporter dans tous les cas les diverses épreuves mentionnées pour chacun des réactifs particuliers.

Il est essentiel d'employer des batteries de référence bien caractérisées (internationales, nationales, provenant

de divers laboratoires, ou d'un même laboratoire).

La dilution en série d'un ou plusieurs échantillons positifs est un moyen utile de déterminer la sensibilité. Le diluant devrait être tel que la composition de l'échantillon dilué soit analogue à celle de l'échantillon soumis à une épreuve de routine, par exemple, il sera préférable de diluer un sérum positif à titrer au moyen d'un sérum négatif (dilué) de la même espèce.

La meilleure façon de vérifier la validité des résultats consiste à inclure des sérums de référence positifs et négatifs dans chaque groupe d'épreuves.

Des résultats positifs aux épreuves de détection des antigènes devront être confirmés par des épreuves de blocage au moyen d'un immunsérum humain ou d'un immunsérum de primate de spécificité établie.

Il ne faut jamais changer plus d'un réactif à la fois. Chaque changement doit s'accompagner d'une évaluation ainsi qu'on l'a signalé dans la section se rapportant aux conjugués.

Surveillance de la technique d'épreuve

Toute nouvelle épreuve ELISA devra être contrôlée dans des conditions variables et à plusieurs reprises après son introduction. Pour une validation, il est nécessaire d'une part d'effectuer des études comparatives avec une ou plusieurs des méthodes sérologiques établies et d'autre part de mettre en rapport les résultats et les observations cliniques.

Il faut évaluer le nouveau système d'épreuve sur un échantillon représentatif de la population à l'étude. Il conviendrait de se montrer prudent en extrapolant les résultats d'épreuve à une autre population car les teneurs en antigènes ou en anticorps, tout comme les (sous)spécificités peuvent varier et il pourrait s'avérer nécessaire de reconsidérer les critères de positivité et de négativité.

Stabilité des réactifs

On devra s'assurer que les réactifs et les combinai-

sons de réactifs conservent pendant une longue période leurs propriétés de spécificité et de sensibilité dans les conditions particulières du laboratoire. Lorsque les réactifs doivent être expédiés d'un laboratoire (ou d'un pays) à un autre, il est parfois difficile de contrôler les conditions de stockage. En conséquence, il pourrait être utile de procéder à une épreuve accélérée de stabilité en soumettant les réactifs à une température et à une humidité élevées. Les conditions de stockage des réactifs et des matériels de référence devront être clairement indiquées. En ce qui concerne les réactifs et les matériels de référence étalonnés, il conviendrait également d'indiquer une date de péremption.

Besoins en matière de standardisation

Réactifs de référence. Ces réactifs sont particulièrement utiles lors de la mise au point de nouvelles épreuves dans un laboratoire.

La fourniture, à l'échelon national ou mieux encore international, d'antigène viral et d'antigène-témoin appropriés à la sensibilisation, permettrait aux laboratoires de déterminer la qualité de leurs propres préparations antigéniques.

Un sous-comité de l'Union Internationale des Associations d'Immunologie et du Comité de Standardisation de l'OMS élabore actuellement un document stipulant les spécifications d'un conjugué anti-immunoglobuline-peroxydase de raifort.

Préparations de référence. Des préparations de référence positives et négatives "connues" doivent être disponibles en grandes quantités pour chacun des systèmes de virus. Chaque laboratoire aura besoin de ses propres matériels de référence à usage quotidien, mais il faut également mettre à disposition des étalons tant nationaux qu'internationaux.

Batteries de référence. On a déjà procédé à l'introduction de batteries de ce type aux Etats-Unis d'Amérique et dans d'autres pays (par exemple pour la sérologie de l'HBsAg et de la rubéole). Il faudrait constituer des batteries nationales ou inter-laboratoires dans d'autres pays.

L'origine des matériels-étalons et les critères utilisés pour leur sélection devraient être rendus publics afin qu'il soit possible de juger de leur applicabilité aux échantillons particuliers qui doivent être titrés.

Exemple d'une technique ELISA indirecte pour la détermination des anticorps anti-cytomégalovirus (CMV)

1. L'antigène du CMV est dilué dans un tampon de sensibilisation à une concentration optimale (prédéterminée par titrage en damier contre des sérums de référence positifs et négatifs). On divise en quatre sections de trois rangées chacune des plaques de polystyrène pour micro-hémagglutination. On place alors 0,2 ml d'antigène CMV dans chaque cupule des deux premières rangées de chaque section. La troisième rangée contient des échantillons de 0,2 ml d'antigène témoin (extrait d'une culture cellulaire non infectée, à la même dilution que l'antigène CMV). On maintient les plaques à 4°C (ou à la température ambiante) dans une atmosphère humide pendant 5 heures puis on les lave en les vidant et en les remplissant à nouveau avec du PBS-polysorbate 20 (Tween 20) contenu dans une bouteille de lavage. Ce procédé est répété trois fois à des intervalles de 3 min.

2. Les sérums à titrer et les sérums étalons sont dilués à 1:200 dans du PBS-polysorbate 20. Puis des échantillons de sérum (0,2 ml) sont éprouvés en double contre l'antigène CMV et une fois seulement contre l'antigène témoin. On fait figurer dans chaque plaque plusieurs échantillons des sérums étalons positifs et négatifs. On fait incuber la plaque pendant 2 heures à la température ambiante puis on procède à une nouvelle série de lavages.

3. On ajoute à chaque cupule 0,2 ml d'immunoglobuline antihumaine diluée, marquée à la phosphatase alcaline puis on conserve les plaques à 4°C jusqu'au lendemain. On procède alors à une nouvelle série de lavages.

4. On place dans chaque cupule 0,2 ml de substrat enzymatique (phosphate de nitro-4 phényle). On laisse la réaction se dérouler à la température ambiante jusqu'au moment où le sérum étalon positif atteint une DO de 1,0 à 405 nm (lue au spectrophotomètre). On arrête alors la réaction avec 0,05 ml de NaOH à 3 mol/l.

On lit ensuite au spectrophotomètre à 405 nm la densité optique du contenu de chacune des cupules. La valeur zéro est donnée par la solution de substrat additionnée de NaOH.

Les valeurs obtenues pour chaque sérum avec l'antigène témoin sont soustraites de celles obtenues avec l'antigène positif. La valeur trouvée est une mesure de la réaction qui s'est effectuée avec la composante CMV de l'antigène. Les valeurs supérieures à celles obtenues avec un mélange de sérums négatifs sont considérées comme positives.

Pour d'autres virus, il convient d'établir les conditions optimales. Tous les antigènes fournis dans le commerce ne sont pas satisfaisants et il convient d'évaluer chaque nouveau lot avant de l'utiliser dans des épreuves de routine.

Applications aux virus humains (18)

Dans le domaine de la virologie, on a commencé par utiliser l'ELISA pour titrer les anticorps antirubéoleux (19,20,21). La variante indirecte a donné des résultats comparables à ceux que fournit l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination. Les antigènes bruts se sont montrés satisfaisants dans la plupart des cas, toutefois dans certaines applications particulières (par exemple la détection des anticorps contre le CSF), des antigènes très purifiés ont donné de meilleurs résultats (22). Lorsqu'on utilise comme indicateur un conjugué anti-IgM marqué par une enzyme, on peut mesurer l'anticorps spécifique de la rubéole dans la fraction IgM du sérum. On recommande de fractionner les sérums avant l'épreuve, par exemple sur du Sephadex G200. La présence concomitante du facteur rhumatoïde et de l'anticorps IgG spécifique produit fréquemment des résultats faussement positifs quant à la teneur en anticorps IgM. On peut éliminer le facteur rhumatoïde en procédant au préalable à une absorption avec de l'IgG aggrégée.

Au moyen d'une méthode ELISA essentiellement semblable à celle mise au point pour la rubéole, il a été possible d'évaluer les anticorps à l'égard des CMV (23,24). La corrélation obtenue entre les résultats de l'ELISA et ceux de

l'épreuve d'immunofluorescence était satisfaisante, et l'ELISA s'est montrée plus sensible que l'épreuve de fixation du complément. On a également évalué, au moyen de l'ELISA, les anticorps IgM dirigés contre le CMV (25).

En raison des très petites quantités d'antigènes nécessaires pour l'ELISA, il a été possible d'utiliser des antigènes rares hautement purifiés dans des épreuves ELISA pour la détection des anticorps contre les virus de l'herpès 1 et de l'herpès 2 (26). On a pu nettement différencier ces deux types. On a également mesuré, de manière analogue, les anticorps à l'égard du virus d'Epstein-Barr (EBV) en employant comme antigène des extraits de cellules P3HRL (27).

On a détecté, au moyen de l'ELISA, les anticorps à l'égard du virus grippal A et du virus respiratoire syncytial (RSV) quelques jours seulement après l'infection, et l'épreuve s'est montrée remarquablement spécifique (22,28). La détection extrêmement précoce des anticorps au moyen de l'ELISA après une vaccination anti-rabique suggère que cette épreuve pourrait être un bon moyen de surveillance de l'efficacité de ce vaccin (29).

Les études préliminaires réalisées avec l'ELISA indiquent clairement que cette technique pourrait convenir à l'évaluation des anticorps dirigés contre les adénovirus, les arbovirus, les virus coxsackie, les virus morbilleux et ourlien et le virus varicello-zonateux (30). La détection des anticorps IgM anti-hépatite A est une nouvelle et importante application de cette technique (31).

La technique ELISA à double couche d'anticorps ("test en sandwich") a été employée pour titrer les rotavirus et pour identifier l'HBsAg. Dans ce dernier cas, on a employé comme supports sensibilisés par l'anticorps correspondant à l'HBsAg des plaques de micro-titrage, des disques et des perles de plastique (32,33). La sensibilité de ces épreuves ELISA est plus grande que celle de l'hémagglutination et comparable au dosage radio-immunologique (RIA). Les réactifs restent stables pendant un an au moins, par conséquent ces épreuves sont parfaitement applicables dans les régions où le RIA ne l'est pas. On a récemment décrit une technique ELISA pour la recherche de l'HBeAg (34).

6. RECHERCHE DES ROTAVIRUS HUMAINS ET DE LA TOXINE
THERMOLABILE D'ESCHERICHIA COLI PAR LA METHODE ELISA

Les rotavirus humains sont une cause importante de diarrhées chez les nourrissons et les enfants dans de nombreuses régions du monde. Les techniques virologiques classiques sont inutilisables pour le diagnostic des infections dues à ce virus, car il n'est pas possible de le multiplier en cultures cellulaires. Il faut donc procéder à l'identification directe de l'antigène dans les matières fécales. Des techniques de dosage radio-immunologique et de contre-immunoelectrophorèse (CIE) (électrosynérèse) ont été mises au point, mais aucun d'entre elles n'est valable pour les études épidémiologiques à grande échelle. C'est pourquoi l'on s'est efforcé de développer une technique de recherche directe des rotavirus dans les fèces reposant sur la méthode ELISA. On avait d'abord employé une technique simple en sandwich analogue à celle qu'on utilise pour la recherche de l'antigène de surface de l'hépatite B, mais on s'est aperçu qu'une technique indirecte utilisant une anti-globuline marquée par une enzyme était plus efficace (Fig. 6) (35). Cette technique possède l'avantage d'être plus sensible et d'exiger des quantités plus faibles de réactifs anti-rotavirus spécifiques. En outre, les systèmes indirects permettent d'employer une seule anti-globuline marquée par une enzyme dans un grand nombre d'épreuves.

Cette technique est reposée sous Méthode 1, page 39. Le chlorure de polyvinyle est le meilleur support pour ce type de dosage. On peut employer d'autres plastiques, mais ils sont moins sensibles et exigent des réactifs plus concentrés. Il est préférable de ne pas utiliser les cupules externes des plaques de micro-titrage en chlorure de polyvinyle, car elles donnent parfois des valeurs faussement élevées. On obtient les résultats les plus précis en n'utilisant que les cupules internes et en remplissant d'eau les cupules externes à chaque étape de l'épreuve. On obtient ainsi un écart inférieur à 5% d'une cupule à l'autre dans l'ensemble de la plaque et l'interprétation visuelle de la coloration est très précise. La lecture visuelle est facilitée par l'introduction, dans plusieurs des cupules, de témoins faiblement positifs, afin que l'observateur puisse comparer l'échantillon à titrer avec ces témoins et lire les résultats de l'épreuve dans des conditions de temps et de température très variées. Les dilutions sont effec-

tuées dans du sérum de fœtus de veau ou de chèvre exempt de rotavirus, afin d'éviter une réactivité croisée non spécifique avec les anticorps anti-bovins ou anti-caprins qui se trouvent parfois dans les selles (36). En outre, chaque échantillon est éprouvé dans des cupules sensibilisées par un sérum de chèvre normal afin d'éviter d'éventuels résultats faussement positifs dus à cet anticorps anti-rotavirus. On peut se procurer les réactifs spécifiques pour le dosage des rotavirus auprès de la Research Resources Branch, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique.

L'application de la méthode ELISA à la recherche des rotavirus peut donner des résultats très précis si l'on confirme la positivité des échantillons au moyen de l'épreuve de blocage décrite sous Méthode 2, page 41. L'utilisation de cette épreuve permet une détermination visuelle très précise, car l'échantillon traité par un sérum de convalescent donne lieu à une moindre coloration que celui qui est traité par un sérum de la phase aiguë. Chaque échantillon peut ainsi être utilisé comme son propre témoin. Dans cette méthode, l'interprétation visuelle est au moins aussi précise qu'en microscopie électronique. Lorsqu'on exécute le dosage de cette manière, on peut détecter des antigènes de rotavirus non révélables par la microscopie électronique.

En raison de la fréquence des infections à Escherichia coli chez les nourrissons, on trouvera plus loin une technique ELISA pour la recherche de la toxine thermolabile d'E. coli. Il est difficile d'obtenir les anticorps dirigés contre la toxine thermolabile purifiée. Par conséquent, il est plus facile d'exécuter le dosage au moyen d'une toxine cholérique immunologiquement apparentée (37). La technique est décrite sous Méthode 3, page 42. On peut utiliser le même conjugué, une globuline anti-cobaye marquée par une enzyme, pour l'identification de la toxine d'E. coli et celle des rotavirus. Exécutée de cette manière, elle est au moins aussi sensible que les systèmes classiques de titrage biologique, tels que le dosage en cellules surrenales y-1.

Méthode 1. ELISA pour la détermination de l'antigène des rotavirus (HRVLA)

Note: N'utiliser que les 60 cupules internes des plaques de micro-titrage. Remplir, à chaque étape de l'épreuve, les cupules externes avec du PBS contenant 0,5 ml de polysorbate 20 (Tween 20) (38) afin d'assurer une distribution équilibrée de la chaleur (voir également Annexe 1). Reconstituer les réactifs avec 1 ml de PBS stérile, pH 7,4.

1. Diluer à 1:20 000 du sérum caprin anti-rotavirus humain dans du tampon carbonate. Ajouter 0,1 ml de cette solution dans les cupules internes de plaques de micro-titrage à fond arrondi en chlorure de polyvinyle souple. Conserver à 4°C jusqu'à l'emploi (24 heures minimum). Sensibiliser également une cupule témoin avec du sérum caprin normal à la même dilution.

2. Juste avant l'épreuve, laver 3 fois avec du PBS-polysorbate 20.

3. Ajouter 0,05 ml d'une suspension de selles (20 à 100 g/l) et 0,05 ml de polysorbate 20 + 10 g/l de sérum de foetus de veau + 5 g/l de sérum caprin. Ajouter, en double exemplaire, la suspension de selles dans les cupules anti-rotavirus et les cupules témoins. Incuber pendant une nuit à 4°C ou 2 heures à 37°C.

4. Laver 3 fois avec du PBS-polysorbate 20.

5. Ajouter 0,1 ml de sérum de cobaye anti-rotavirus humain dilué à 1:500 à un mélange de PBS-polysorbate 20 + 10 g/l de sérum de foetus de veau + 5 g/l de sérum caprin. Incuber pendant 1 heure à 37°C. On peut essayer des dilutions plus fortes de sérum de cobaye (selon la concentration des échantillons).

6. Laver 3 fois avec du PBS-polysorbate 20.

7. Ajouter 0,1 ml de sérum anti-cobaye marqué par de la phosphatase alcaline dilué à 1:400 à un mélange de PBS-polysorbate 20 + 10 g/l de sérum de foetus de veau + 5 g/l de sérum caprin. Incuber pendant 1 heure à 37°C.

8. Laver 3 fois avec du PBS-polysorbate 20.

9. Ajouter 0,1 ml de solution de substrat (voir Annexe 1).

10. Incuber à la température ambiante jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune. Avec un échantillon positif, on aura visiblement plus de couleur dans les cupules anti-rotavirus que dans les cupules témoins. Comparer cette coloration jaune avec celle d'un étalon faiblement positif (ou d'une dilution d'un mélange de sérums positifs). Le virus Nebraska de la diarrhée chez le veau devrait être faiblement positif à des dilutions de 1:20 à 1:50. Il faudra confirmer les échantillons douteux au moyen d'une épreuve de blocage.

Méthode 2. Epreuve de blocage pour la confirmation de l'antigène des rotavirus

1. Ajouter 0,075 ml d'un filtrat de selles à 0,075 ml de sérum de pré-infection dilué à 1:10 à du PBS contenant 0,5 ml de polysorbate 20 (Tween 20) par litre.¹ (On peut également utiliser un sérum de fœtus de veau.) Ajouter 0,075 ml de filtrat de selles à 0,075 ml de sérum étalon de post-infection dilué à 1:10 dans du PBS-polysorbate 20.¹

2. Incuber ce mélange à 37°C pendant 1 heure au minimum.

3. Introduire, en double exemplaire, 0,05 ml du mélange dans les cupules d'une plaque de micro-titrage sensibilisée par du sérum caprin anti-rotavirus, et procéder comme pour les échantillons de selles.

4. Lorsqu'on ajoute le sérum de post-infection les selles contenant des rotavirus doivent montrer une coloration jaune au moins 50% moins forte qu'avec le sérum de pré-infection.²

¹ Cette dilution sera ajustée selon la concentration du sérum étalon utilisé.

² Si l'on ne parvient pas à une diminution de 50%, il convient de diluer l'échantillon de selles pour vérifier que ce phénomène n'est pas dû à un excès d'antigène.

Méthode 3. Recherche de la toxine cholérique et de la toxine thermolabile d'*E. coli*

1. Diluer une anti-toxine cholérique obtenue sur cheval à 1:10 000 dans du tampon carbonate au pH 9,6.¹ Ajouter 0,1 ml de cette solution dans les 60 cupules internes d'une microplaque en chlorure de polyvinyle. Incuber à 4°C pendant 14 heures au moins. Conserver les plaques à 4°C jusqu'à l'emploi.

2. Laver. Ajouter 0,1 ml de bouillon ou de culture. Incuber à la température ambiante pendant 2-14 heures. Utiliser comme témoin étalon la souche 408-3 (*E. coli* lyophilisée qui produit la toxine thermolabile (LT)). Diluer pour obtenir des concentrations de 0,1, 0,01 et 0,001 g/l de toxine d'*E. coli*.

3. Laver. Ajouter du sérum de cobaye anti-toxine cholérique dilué à 1:2000 dans un mélange de PBS contenant 0,5 ml de polysorbate 20 (Tween 20) + 10 g/l de sérum de fœtus de veau + 10 g/l de sérum normal de cheval.² Incuber pendant 1 heure à 37°C.

4. Laver. Ajouter un sérum anti-cobaye marqué par une enzyme, dilué à 1:800 dans le mélange décrit ci-dessus. Incuber pendant 1 heure à 37°C.

5. Laver. Ajouter le substrat et lire les résultats par comparaison avec le témoin étalon 408-3. Considérer comme positifs les échantillons dont l'intensité de coloration est au moins aussi forte que celle du témoin étalon *E. coli* LT 408-3. La sensibilité de ce dosage se situe généralement entre 0,01 et 0,001 g/l.

¹ Si le stock est fourni à une dilution de 1:5, utiliser une dilution de 1:2000.

² Si le stock est fourni à une dilution de 1:5, utiliser une dilution de 1:400.

7. TITRAGE DES ANTICORPS ANTI-ROTAVIRUS
PAR LA METHODE ELISA

On peut utiliser la méthode ELISA pour titrer les anticorps anti-rotavirus. Toutefois l'adaptation de la technique ELISA classique à la mesure de la réaction sérologique aux rotavirus pose un problème au niveau de l'antigène. En effet, ce virus se multiplie mal en culture cellulaire; par conséquent, il est difficile d'obtenir un virus assez pur pour être employé comme antigène. Lorsqu'on utilise un antigène impur, il y a interférence par réaction croisée avec des antigènes étrangers aux rotavirus. On pourrait certes purifier le virus obtenu à partir de matières fécales par sédimentation dans le saccharose ou centrifugation isopycnique en chlorure de césium, mais cette méthode est difficile à réaliser à grande échelle. Une des méthodes de remplacement consiste à sensibiliser au préalable les plaques de chlorure de polyvinyle par des anticorps anti-rotavirus hyperimmuns, comme cela se fait dans le titrage des antigènes, puis à ajouter une source habituelle d'antigène de rotavirus diluée dans un détergent non ionique, comme le polysorbate 20 (Tween 20) et dans un excès d'une protéine neutre, comme le sérum de fœtus de veau (39). Si l'on emploie cette méthode, seul l'antigène du rotavirus se fixera à la phase solide. Les antigènes croisés seront éliminés au cours des lavages. On trouvera une description du mode opératoire sous Méthode 4, page 44. On peut exprimer les résultats soit sous la forme d'un titre final soit sous la forme du rapport positif/négatif (P/N), qui est égal au quotient de la densité optique du sérum à titrer par celle d'un sérum étalon négatif de même dilution. Pour plus de précision, on peut employer une série de dilutions puis déterminer une valeur P/N moyenne. Exécutée de cette manière, la méthode ELISA est plus sensible que les épreuves classiques de fixation du complément ou d'immunofluorescence tout en conservant par ailleurs les autres avantages des systèmes de titrage ELISA.

Méthode 4. Titration par liaison des anticorps anti-rotavirus

1. Sensibiliser une plaque pour micro-méthode ELISA (Cooke 220-29) ou une microplaque équivalente au moyen de sérum caprin antirotavirus dilué à 1:10 000 dans du tampon carbonate. Incuber à 4°C pendant une nuit au minimum.

2. Laver la plaque. Ajouter l'antigène dilué dans du PBS additionné de 0,5 ml de polysorbate 20 (Tween 20) par litre. Incuber pendant 2 heures à 37°C ou pendant une nuit à 4°C. Conserver les plaques à 4°C en y laissant l'antigène. Cet antigène devrait être un filtrat ou une suspension à 20-100 g/l, dépourvu de bactéries, additionné d'azoture de sodium à 2 g/l. La dilution optimale sera déterminée par titrage en damier. L'antigène utilisé est une suspension de selles de veau à 20 g/l contenant la souche de rotavirus humain 75-80 dilué à 1:10 (pour les épreuves courantes, il faut utiliser 10 unités d'antigènes).

3. Laver la plaque le matin même de l'épreuve. Ajouter le sérum ou le liquide dilué dans un mélange de PBS-polysorbate 20 + du sérum de fœtus de veau à 10 g/l et du sérum caprin à 5 g/l, ce dernier étant dépourvu d'anticorps anti-rotavirus. On peut employer les sérums aux dilutions suivantes: 1:100, 1:400, 1:1600 et procéder aux dilutions dans la plaque pré-sensibilisée au moyen d'une pipette multicanal Titertek. Incuber pendant 2 heures à 37°C ou pendant une nuit à 4°C.

4. Laver la plaque. Ajouter un conjugué approprié marqué par une enzyme et dilué dans un mélange de PBS-polysorbate 20 + le sérum de fœtus de veau à 10 g/l + le sérum caprin à 5 g/l. Selon le conjugué, incuber pendant 1 à 2 heures à 37°C.

5. Laver puis ajouter le substrat. Comparer la coloration jaune obtenue avec celle d'un témoin positif connu aux mêmes dilutions. (On peut employer pratiquement n'importe quel sérum d'adulte.)

8. SERODIAGNOSTIC DE L'HEPATITE VIRALE AIGUE DE TYPE A
PAR DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE L'IgM

Contrairement au virus de l'hépatite B (HBV), une infection par le virus de l'hépatite A (HAV) ne se traduit pas par une virémie facilement décelable par les méthodes sérologiques. En outre, la majeure partie des HAV étant fréquemment excrétés dans les fèces bien avant l'apparition des symptômes cliniques, il n'est ni possible ni pratique de rechercher, à des fins diagnostiques, la présence d'HAV dans des suspensions de selles prélevées à la phase aiguë (40). Toutefois, comme c'est le cas pour de nombreuses infections virales aiguës, l'hépatite A donne lieu à une production d'anticorps précoces (de la phase aiguë) qui sont principalement des immunoglobulines de la classe IgM (41). On a récemment décrit des méthodes de dosage radio-immunologique (RIA) qui permettent une caractérisation différentielle des anticorps HAV du type IgM ou IgG (41), d'où la possibilité de distinguer les anticorps de la phase aiguë (IgM) des anticorps de la phase de convalescence ou des anticorps pré-existants (IgG). On peut désormais diagnostiquer un cas aigu d'hépatite virale A par titrage sérologique d'un seul échantillon de la phase aiguë.

La seule épreuve d'identification de l'anticorps anti-HAV à être commercialisée est une méthode radio-immunologique de fixation compétitive, qui utilise un système d'épreuve dans lequel l'HAV est fixé à la surface d'une perle de polystyrène. Dans cette épreuve, l'HAV de la phase solide peut se combiner soit avec l'anticorps IgM ou IgG anti-HAV présent dans le sérum du malade, soit avec un anticorps IgG anti-HAV marqué à l'iode-125 et utilisé comme "pierre de touche" de l'épreuve. Si le sérum d'un malade ne contient pas d'anticorps anti-HAV, l'addition d'une perle de polystyrène sensibilisée par l'HAV à un mélange composé de ce sérum et de la "pierre de touche" aura pour effet la fixation maximale de l'IgG marquée par ¹²⁵I. Par contre, si ce sérum est porteur de l'anticorps, l'addition de la perle sensibilisée à un mélange composé de ce sérum et de la "pierre de touche" donnera lieu à une fixation moins forte de l'IgG marquée par ¹²⁵I. L'anticorps anti-HAV du malade, qu'il soit constitué d'IgM ou d'IgG dispute en effet les sites de fixation de l'HAV à l'IgG anti-HAV marquée par

¹²⁵I. Il y a lieu de penser que les sérums possédant des titres élevés (ou les sérums possédant des anticorps à forte avidité) disputeront plus âprement les sites de fixation à l'IgG anti-HAV marquée par ¹²⁵I dans ce radio-immunosage par compétition. On a qualifié cette technique de "dosage par fixation compétitive" (CBA).

Du fait que la plupart des anticorps de la phase aiguë sont des IgM, toute épreuve capable de détecter, de façon différentielle, la présence d'IgM ou d'IgG anti-HAV devrait être applicable au sérodiagnostic de l'hépatite virale aiguë de type A. Le CBA du commerce permet dans sa forme classique de déceler les anticorps anti-HAV, qu'il s'agisse d'IgM ou d'IgG. On ne peut donc l'utiliser telle quelle pour le sérodiagnostic de l'hépatite aiguë A. On a par conséquent mis au point un procédé CBA modifié qui permet une caractérisation différentielle de l'IgM et l'IgG. Le CBA modifié est fondé sur le principe de l'absorption préférentielle de l'IgG anti-HAV contenu dans le sérum d'un malade par la protéine A, qui est un constituant de la membrane cellulaire de Staphylococcus aureus. La protéine A ayant une affinité beaucoup plus élevée pour l'IgG que pour l'IgM, tout sérum contenant principalement de l'IgM (anticorps de la phase aiguë) devrait demeurer anti-HAV positif, après absorption, dans l'épreuve CBA classique. Par conséquent, le diagnostic de l'hépatite aiguë A par le procédé CBA modifié dépend des effets de l'absorption de la protéine A sur l'activité anti-HAV du malade. Le procédé CBA modifié est exécuté de la manière décrite sous Méthode 5, page 48. Les résultats sont évalués au moyen des critères donnés dans la Méthode 6, page 49. L'épreuve CBA classique, sur laquelle est fondée l'épreuve CBA modifiée, est exécutée et évaluée de la manière décrite sous Méthode 7, page 51.

Il est important de noter que le procédé CBA modifié donne les résultats les plus constants lorsqu'on prélève les sérums de la phase aiguë dans les 3 à 4 semaines suivant l'apparition des symptômes cliniques. Les sérums recueillis plus tard contiennent parfois des taux importants d'IgG anti-HAV qui entraîneront des résultats ambigus. En outre, il conviendrait de ne pas éprouver les sérums à des dilutions inférieures à 1:2, car la quantité de protéine A utilisée dans la méthode CBA modifiée pourrait s'avérer incapable d'absorber la majeure partie de l'IgG. Dans ces

conditions, l'échantillon à titrer absorbé pourrait demeurer IgG-positif et la valeur de R pourrait être inférieure à 2,5 (Méthode 6, page 49). Les sérums qui sont anti-HAV négatifs à des dilutions de 1:2 ne peuvent pas être typés. Pour que l'épreuve CBA modifiée soit valable, on a également constaté que les sérums dilués non absorbés devaient fournir des valeurs au plus égales à la moitié de la valeur de coupure obtenue dans l'épreuve CBA classique. Les sérums non absorbés qui donnent un nombre de coups par minute supérieur à la moitié de la valeur de coupure risquent de fournir des valeurs de R trop basses, puisque le quotient ($NC\bar{x}$) (nb de coups/minute de l'échantillon) a un numérateur constant (fixe) (voir Méthode 7, page 51). Il faudra procéder à un deuxième dosage, à une dilution plus faible, des sérums dilués, non absorbés qui entrent dans cette catégorie.

Méthode 5. Procédé CBA modifié pour l'identification différentielle des IgG et des IgM anti-HAV

1. Préparer une suspension de 1 g de cellules de staphylocoques desséchées (souche Newman D₂C) dans 10 ml de PBS à 0,01 mol/l, pH 7,2, contenant 0,25 g/l d'azoture de sodium comme agent de conservation. Ce mélange constitue la suspension de protéine A.
2. Introduire à la pipette des volumes de 0,1 ml de la suspension de protéine A dans des tubes à micro-centrifugation de 1-ml (un volume par dilution de sérum).
3. Centrifuger ces aliquotes de la suspension cellulaire pendant 1 minute à la vitesse maximum dans une centrifugeuse micro-capillaire; jeter le surnageant et utiliser le culot cellulaire de la manière décrite en 5.
4. Diluer le sérum à titrer dans du PBS à 0,01 mol/l, pH 7,2 (contenant 0,25 g/l d'azoture de sodium) jusqu'à un volume final de 0,15 ml. Le volume de sérum ajouté dépend du "pourcentage de compétition" du sérum non dilué dans l'épreuve CBA classique. Si ce pourcentage est égal ou supérieur à 90%, le sérum devra être titré à une dilution de 1:15. S'il est inférieur à 90%, on opérera à une dilution de 1:5.
5. Ajouter 0,1 ml de sérum dilué au culot cellulaire, mélanger puis incubé pendant 30 minutes à la température ambiante (25°C).
6. Centrifuger le mélange afin de sédimenter à nouveau les cellules.
7. Titrer 0,01 ml du surnageant obtenu au moyen du procédé CBA classique (Méthode 7, page 51). Il s'agit du sérum à titrer absorbé.
8. Titrer 0,01 ml du sérum à titrer non absorbé et dilué (voir point 4 ci-dessus) au moyen du procédé CBA classique (Méthode 7, page 51).
9. Evaluer les résultats de l'épreuve (Méthode 6, page 49).

Méthode 6. Evaluation des résultats de l'épreuve CBA modifiée

1. Les résultats de l'épreuve doivent être évalués selon deux critères:

(i) La positivité du sérum dilué après absorption par la protéine A.

(ii) Le rapport du nombre de coups/minute du sérum à titrer dilué avant (-A) et après (+A) absorption par la protéine A (rapport, $R = (+A)/(-A)$). Ce critère est le plus important.

2. Interprétation des résultats de l'épreuve:

Moins protéine A (-A)	Plus protéine A (+A)	R	anti-HAV
-	-	NC ^a	nég. (ne peut pas être typé) ^b
+	+	$< 2,5$	Principalement IgM ^c
+	+	$\geq 2,5$	Mélange IgM + IgG ^c
+	-	$> 2,5$	Principalement IgG ^d

^a NC = non calculé

^b Les sérums (anti-HAV)-négatifs à une dilution de 1:5 ne peuvent pas être typés.

^c Les sérums qui sont (anti-HAV)-positifs après absorption par la protéine A contiennent principalement des IgM anti-HAV si $R < 2,5$, et un mélange d'IgM et d'IgG si $R \geq 2,5$. Ces derniers sérums proviennent généralement de malades en fin de phase aiguë ou en début de convalescence de l'hépatite A.

^d Les sérums qui sont négatifs après absorption par la protéine A, ou qui ont une valeur $R > 2,5$ contiennent principalement des IgG anti-HAV (de convalescent ou pré-existants).

3. Il est possible que les sérums donnent des résultats ambigus si:

- (i) Ils sont éprouvés sans dilution.
- (ii) Ils sont recueillis auprès de malades suspects d'hépatite A plus de 4 semaines après l'apparition des symptômes cliniques.
- (iii) Le sérum dilué donne une valeur supérieure à la moitié de la valeur de coupure obtenue dans l'épreuve CBA (voir Méthode 7, page 51).

Méthode 7. Méthode CBA pour la recherche de l'anticorps anti-HAV

1. Déposer à l'aide d'une micropipette 0,01 ml de chaque échantillon de sérum (ou de sérum dilué) au fond des cupules d'une plaque à réaction à 20 cupules.
 2. Ajouter dans chaque cupule contenant les échantillons 0,2 ml d'anticorps anti-HAV marqué à l'iode-125.
 3. Dans chaque cupule, introduire avec précaution une bille enrobée de HAV, placer le couvercle sur la plaque et tapoter légèrement celle-ci afin que toutes les billes soient recouvertes par le mélange réactionnel.
 4. Incuber les plaques à 45°C pendant 4 h ou à la température ambiante pendant 18 à 24 h.
 5. Oter et jeter le couvercle, aspirer le contenu des cupules et laver les billes avec 2 fractions de 5 ml d'eau distillée ou désionisée.
 6. Placer les billes dans un tube de comptage et compter les coups pendant 1 min au moyen d'un compteur à scintillation gamma de type à puits.
 7. On peut conclure à l'absence ou à la présence d'anticorps anti-HAV en comparant le taux de comptage net (nb de coups/min) à une valeur de coupure calculée comme indiqué ci-dessous.
 8. Calculer la valeur de coupure en divisant par 2 la somme du nombre de coups moyen obtenu avec les témoins négatifs ($NC\bar{x}$; moyenne de 5 témoins négatifs) et du nombre de coups moyen obtenu avec les témoins positifs ($PC\bar{x}$; moyenne de 3 témoins positifs). Exemple: $(NC\bar{x} + PC\bar{x})/2 = (20\ 000 + 950)/2 = 10\ 475$ coups/min.
- (a) Les échantillons de sérums qui donnent un nombre de coups/minute supérieur à la valeur de coupure sont anti-HAV-négatifs.
- (b) Les échantillons de sérums qui donnent un nombre de coups/minute inférieur à la valeur de coupure sont anti-HAV-positifs.
- (c) Le pourcentage de compétition du sérum à titrer est calculé de la manière suivante: $(1 - (\text{nb de coups/min de l'échantillon à titrer} / NC\bar{x})) \times 100$.
-

BIBLIOGRAPHIE

1. Techniques de laboratoire pour le diagnostic rapide des infections virales: Mémoire. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 56: pp. 99-103 (1978).
2. Progrès en matière de diagnostic rapide des infections virales: Mémoire. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 56: pp. 761-771 (1978).
3. GARDNER, P.S. ET AL. Bulletin of the World Health Organisation, 56: 105 (1978).
4. Laboratory techniques for the detection of hepatitis B surface antigen. Atlanta, GA, Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, 1977 (HEW Publication).
5. LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J., éd. Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections, 4th edition. New York. American Public Health Association, 1969 (5ème édition en préparation).
6. GARDNER, P.S. & Mc QUILLIN, J. Rapid virus diagnosis - application of immunofluorescence. London, Butterworth, 1974.
7. GOLDWASSER, R.A. & KISSLING, R.E. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 98: 219 (1958).
8. DEBBIE, J.G. ET AL. Infection and immunity, 5: 902 (1972).
9. AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. Immunochemistry, 6: 53 (1969).
10. ATANASIU, P. ET AL. Annales de microbiologie, 125B: 85 (1974).
11. AVRAMEAS, S. & URIEL, J. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences, 262: 2543 (1966).

12. NAKANE, P.K. & PIERCE, G.B. Journal of histochemistry and cytochemistry, 14: 929 (1966).
13. ATANASIU, P. ET AL. Annales de l'Institut Pasteur, 121: 247 (1971).
14. ENGVALL, E. & PERLMANN, P. Immunochemistry, 8: 871 (1971).
15. ATANASIU, P. & PERRIN, P. Annales de microbiologie, 130A: 257 (1979).
16. ENGVALL, P. & PERLMANN, P. Journal of immunology, 109: 129 (1972).
17. VAN WEEMEN, B.K. & SCHUURS, A.W.W.M. FEBS letters, 15: 232 (1971).
18. SEVER, J.L. & MADDEN, D.L., éd. Journal of infectious diseases, 136, Suppl. Oct. 1977.
19. VOLLER, A. & BIDWELL, D.E. British journal of experimental pathology, 57: 243 (1976).
20. GRAVELL, M. ET AL. Journal of infectious diseases, 136: (Suppl.) S300 (1977).
21. VEJTORP, M. Acta pathologica et microbiologica Scandinavica, B86: 387 (1978).
22. LEINIKKI, P. & PASSILA, S. Journal of clinical pathology, 29: 1116 (1976).
23. VOLLER, A. ET AL. In: Rose, N.R. & Friedman, H., éd. Manual of clinical immunology. Washington DC, American Society of Microbiology, 1976, p. 506.
24. CASTELLANO, G.A. ET AL. Journal of infectious diseases, 136: (Suppl.) S337 (1977).
25. SCHMITZ, H. ET AL. Journal of clinical microbiology, 5: 629 (1977).
26. VESTERGAARD, B.F. ET AL. Acta pathologica et microbiologica Scandinavica, B85: 466 (1977).

27. WALLEN, W.C. ET AL. Journal of infectious diseases, 136: (Suppl.) S324 (1977).
28. BISHAI, F.R. & GALLI, F. Journal of clinical microbiology, 8: 648 (1978).
29. ATANASIU, P. ET AL. Annales de microbiologie, 128A: 489 (1977).
30. BIDWELL, D.E. ET AL. Journal of infectious diseases, 136: (Suppl.) S274 (1977).
31. DUERMEYER, W. & VAN DER VEEN, J. Lancet, 2: 684 (1978).
32. WOLTERS, G. ET AL. Journal of clinical pathology, 29: 873 (1976).
33. HALBERT, S.P. & ANKEN, M. Journal of infectious diseases, 136: (Suppl.) S318 (1977).
34. VAN DER WAART, M. ET AL. Journal of medical virology, 3: 43 (1978).
35. YOLKEN, R.H. ET AL. Lancet, 2: 263 (1977).
36. YOLKEN, R.H. ET AL. Lancet, 2: 819 (1977).
37. YOLKEN, R.H. ET AL. Infection and immunity, 14: 471 (1978).
38. ROSE, N.R. & FRIEDMAN, H., éd. Manual of clinical immunology. Washington, DC, American Society of Microbiology, 1976, p. 511.
39. YOLKEN, R.H. ET AL. Journal of clinical microbiology, 6: 439 (1977).
40. DIENSTAG, J.L. ET AL. Lancet, 1: 765 (1975).
41. BRADLEY, D.W. ET AL. Journal of clinical microbiology, 5: 521 (1977).

ANNEXE 1

ELISA - MATERIEL ET METHODES

Support

Plaques de micro-hémagglutination en polystyrène (jetables).

Tampon de sensibilisation

Carbonate-bicarbonate (pH 9,6): 1,59 g de Na_2CO_3 , 2,93 g de NaHCO_3 , et 0,2 g de NaN_3 complétés à un litre par de l'eau distillée. Conserver à 4°C pendant 2 semaines au maximum.

PBS-polysorbate 20 (Tween 20)

Composé de 8,0 g de NaCl , 0,2 g de KH_2PO_4 , 2,9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl , 0,5 ml de polysorbate 20, et 0,2 g de NaN_3 dans 1 litre d'eau distillée. Le pH est de 7,4. Conserver à 4°C.

Conjugués (il faudra environ 20 ml de conjugué dilué pour chaque plaque).

(a) Globuline anti-IgG humaine obtenue sur mouton et marquée à la phosphatase alcaline. Conserver sous forme concentrée à 4°C avec addition d'azote de sodium comme agent de conservation. Diluer extemporanément la solution mère dans du PBS-polysorbate 20.

(b) Globuline anti-IgG humaine obtenue sur mouton et marquée à la peroxydase de raifort. Stocker sous forme lyophilisée ou en solution à -20°C. Préparer extemporanément la quantité requise et la diluer dans du PBS-polysorbate 20.

Substrats

(a) Pour les conjugués de phosphatase alcaline:

Tampon di-éthanolamine (100 g/l) composé de 97 ml de di-éthanolamine, 800 ml d'eau, 0,2 g de NaN_3 , et 100 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Ajouter de l'HCl à 1 mol/l pour obtenir un pH de 9,8. Le volume total est complété à 1 litre par de

l'eau. Conserver à 4°C dans l'obscurité. Prélever la quantité nécessaire (20 ml par plaque) 1 à 2 heures avant l'emploi de la solution de substrat pour qu'elle atteigne la température ambiante.

La solution de substrat est composée de phosphate de nitro-4 phényle (1 g/l). Les comprimés (5 mg) sont stockés à -20°C dans l'obscurité jusqu'à l'emploi. On dissout extemporanément les comprimés dans le tampon di-éthanolamine à 100 g/l (1 comprimé/5 ml), amené à la température ambiante. (Il faut 20 ml par plaque.) Cette solution doit être utilisée le jour même.

Solution pour le blocage de la réaction: NaOH à 3 mol/l.

(b) Pour les conjugués marqués à la peroxydase:

Tampon phosphate-citrate de pH 5,0 composé de 24,3 ml d'acide citrique à 0,1 mol/l (192 g/l), 25,7 ml de phosphate à 0,2 mol/l (28,4 g de Na₂HPO₄/l) et 50 ml de H₂O.

La solution de substrat (o-phénylène-diamine) doit être préparée extemporanément. Dissoudre 40 mg de o-phénylène-diamine dans 100 ml du tampon décrit ci-dessus et ajouter 0,15 ml de H₂O₂ à 300 g/l.

Ce substrat est photosensible et doit être utilisé immédiatement.

Solution pour le blocage de la réaction:
H₂SO₄ à 2 Mol/l.
