

**COMPARAISON DE DEUX MÉTHODES IN VITRO
DE TITRAGE DES ANTICORPS NEUTRALISANT
LE VIRUS DE LA PESTE PORCINE CLASSIQUE**

G. Corthier, G. Galicher, J. Gelfi

► **To cite this version:**

G. Corthier, G. Galicher, J. Gelfi. COMPARAISON DE DEUX MÉTHODES IN VITRO DE TITRAGE DES ANTICORPS NEUTRALISANT LE VIRUS DE LA PESTE PORCINE CLASSIQUE. Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions, 1976, 7 (4), pp.349-360. <hal-00900903>

HAL Id: hal-00900903

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00900903>

Submitted on 1 Jan 1976

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

COMPARAISON DE DEUX MÉTHODES *IN VITRO* DE TITRAGE DES ANTICORPS NEUTRALISANT LE VIRUS DE LA PESTE PORCINE CLASSIQUE

G. CORTHIER

avec la collaboration technique de G. GALICHER et J. GELFI

*Laboratoire de Pathologie porcine,
I. N. R. A., 78850 Thiverval-Grignon*

RÉSUMÉ

La neutralisation *in vitro* de la Peste porcine a été étudiée en mettant en œuvre la méthode à « sérum constant » : la perte du pouvoir infectieux est mesurée consécutivement à la mise en contact d'un nombre variable de particules infectieuses et d'une dilution fixe du sérum. La différence entre le titre infectieux avant et après la réaction représente l'index de neutralisation (I.N.).

Les auteurs ont montré que la neutralisation du virus de la Peste porcine peut être décrite par la loi d'action de masse. En conséquence il existe une relation linéaire entre l'I.N. et le logarithme de la dilution de sérum ($\log D$) du type $IN = IN_0 - K \log D$ (1) où K est une constante fonction partiellement de la classe d'immunoglobuline portant l'activité anticorps. La valeur moyenne de K est égale à 3. IN_0 est l'I.N. obtenu pour une extrapolation de la courbe à une valeur zéro de $\log D$.

Ces résultats permettent de comparer la méthode de séroneutralisation à « sérum constant » à celle à « sérum variable » pour laquelle on mesure la dilution de sérum inhibant 50 p. 100 du pouvoir infectieux (D_{50}). En effet de la formule (1) on tire : $\log D_{50} = 1/3 (I.N. - 0,3 + 3 \log D)$. Les valeurs théoriques et expérimentales de $\log D_{50}$ diffèrent peu (écart inférieur ou égal à 0,3). La D_{50} peut donc être déterminée par l'une ou l'autre des deux méthodes.

INTRODUCTION

La neutralisation des virus a fait l'objet de nombreuses études, tant du point de vue théorique (DULBECCO, VOGT STRICKLAND, 1956 ; FAZEKAS DE SAINT GROTH, WATSON et REID, 1958 ; FAZEKAS DE SAINT GROTH et WEBSTER, 1963 *a* et *b* ; LAFFERTY, 1963 *a* et *b* ; LAFFERTY et OERTELIS, 1963), que pratique (facteurs susceptibles d'influencer la réaction) :

— la réversibilité de la réaction (MANDEL, 1961 et 1967 *a* et *b* ; FAZEKAS DE SAINT GROTH et WEBSTER, 1963 *a* ; RADWAN et BURGER, 1973 *a* ;

— la dépendance vis-à-vis du complément (HYLLSETH et PETERSON, 1970 ; WALLIS et MELNICK, 1971 ; POULAIN, GOURREAU et DAUTIGNY, 1972 ; RADWAN et BURGER, 1973 *b* ; WITTMAN, BARTENBACH et JAKUBIK, 1976) ;

— le rôle de facteurs sériques non hémolytiques (WAY et GARWES, 1970).

En ce qui concerne l'étude de la réponse immunitaire du porc au virus de la Peste porcine, pendant longtemps seul le test de résistance à l'épreuve était disponible. Depuis l'introduction des techniques d'immunofluorescence (AVNAUD et BIBARD, 1971), on a de plus en plus recours à la cinétique d'apparition des anticorps neutralisant le virus. Deux méthodes de séroneutralisation étaient à notre disposition :

1° La méthode dite à « sérum variable » ; à un nombre de particules infectieuses on ajoute différentes dilutions de sérum, le volume final restant constant. Après mesure du pouvoir infectieux du mélange on détermine graphiquement la dilution de sérum inhibant 50 p. 100 du pouvoir infectieux viral.

2° La méthode dite à « sérum constant » ; on mesure la perte du pouvoir infectieux consécutive à la mise en contact d'un nombre variable de particules infectieuses et d'une dilution fixe de la solution d'anticorps. La différence entre le nombre d'unités formant des plages avant (V_0) et après (V_r) la réaction de neutralisation représente l'index de neutralisation (I.N.) : $I.N. = \log (V_0/V_r)$. La relation entre cet index et la concentration en anticorps employée lors du test varie selon les virus étudiés (FAZEKAS DE SAINT GROTH, WATSON et REID, 1958 ; BRADISH, FARLEY et FERRIER, 1962 ; WESTAWAY, 1965 *a* et *b* ; HECKE, 1967 ; WAY et GARWES, 1970 ; WIKTOR et CLARK, 1973). Elle est le plus souvent linéaire. Les paramètres de la droite doivent cependant être déterminés pour chaque virus.

Dans le cadre de l'étude des antisérums spécifiques de virus de la Peste porcine, le pouvoir infectieux résiduel (après neutralisation) est déterminé en culture cellulaire par la méthode des plages des cellules fluorescentes car le virus n'est pas cytopathogène *in vitro*. Dans ce système et pour des raisons pratiques, la méthode de séroneutralisation à « sérum constant » est plus facile à mettre en œuvre que celle à « sérum variable ». Nous l'avons donc choisi pour la poursuite de nos recherches. Ce choix une fois établi, restait à déterminer :

a) dans quelle mesure cette méthode de séroneutralisation à « sérum constant » était applicable à la mesure des activités neutralisantes dans les sérums et les sécrétions ;

b) comment nos résultats pouvaient être comparés à ceux obtenus par la méthode à « sérum variable ».

Dans ce rapport nous présentons les études relatives à l'influence de la dilution de l'antisérum sur la valeur de l'I.N.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1° Cultures de cellules PK₁₅

Pour la production et le titrage du pouvoir infectieux du virus de la Peste porcine nous avons utilisé la lignée cellulaire de rein de porc PK₁₅ qui nous a été fournie par le Laboratoire national des maladies animales (Ames, Iowa, U.S.A.). Les conditions optimales de culture cellulaire sont obtenues en employant un milieu Eagle MEM additionné de 5 p. 100 de sérum embryonnaire de veau, dépourvu d'inhibiteurs de la croissance virale (Gibco).

2° *Virus de la Peste porcine*2. 1. — *Souches utilisées.*

— La souche « Alfort » est un clone isolé après 19 passages à 37°C dans des cellules PK₁₅ à partir d'une souche d'épreuve hautement virulente utilisée au Laboratoire central de Contrôle et de Recherches des Service vétérinaires de Maisons-Alfort (AYNAUD, 1968).

— La souche « Thiverval » est un clone isolé à partir de cette même souche après plus de 170 passages à 29°C en culture cellulaire, au cours desquels il a été pratiqué un grand nombre de passages (65) aux dilutions limites afin de sélectionner les particules virales les plus aptes à se développer à basse température (AYNAUD *et al.*, 1972).

— La souche « 331 » fournie par le docteur MENGELING du Laboratoire national des Maladies animales, Ames, Iowa (U.S.A.) a été isolée aux États-Unis sur le terrain dans un foyer de Peste porcine subaiguë. Cette souche serait responsable des formes chroniques de la maladie MENGELING et PAKER, 1969). Elle diffère sérologiquement de la souche hautement virulente « Ames (PITTLE, 1971) et de la souche « Alfort » (CORTIER *et al.*, 1974).

2. 2. — *Préparation des stocks de virus.*

La production des diverses souches étudiées est effectuée sur des tapis confluent de cellules PK₁₅; après une heure d'adsorption, les cellules recouvertes de milieu de maintien sont incubées à :

— 39°C pendant quarante-huit à soixante-douze heures pour la souche « Alfort » titre maximal 10⁷ UFP/ml ;

— 31°C pendant quatre jours pour la souche « Thiverval » titre maximal 10⁷ UFP/ml ;

— 37°C pendant quarante-deux à soixante-douze heures pour la souche « 331 », titre maximal 10⁸ UFP/ml.

Ces températures correspondent aux températures optimales de développement de chacune des souches déterminées dans les conditions de cycle unique.

Toutes les souches sont conservées à — 25°C en présence de 10 p. 100 de diméthylsulfoxyde (DMSO).

2. 3. — *Titrage du pouvoir infectieux.*

Le titrage du pouvoir infectieux est réalisé dans des tubes de Leighton renfermant à l'état confluent une couche monocellulaire de cellulaires PK₁₅. Après infection, les tubes sont incubés pendant vingt-quatre heures à des températures identiques à celles de production des diverses souches, puis pendant une nuit à 28°C. Après avoir éliminé le milieu de maintien, les cellules sont fixées à l'acétone, puis colorées à l'aide d'anticorps fluorescents spécifiques du virus de la Peste porcine. Le nombre d'unités formant des plages de cellules fluorescentes est déterminé à l'aide d'un microscope à ultraviolet Leitz-Orthoplan (AYNAUD, 1968).

3° *Immunsérums spécifiques du virus de la Peste porcine*

L'injection de 5 ml de surnageant clarifié de suspension virale contenant la souche « Thiverval » est faite par voie intramusculaire à des porcs dépourvus d'anticorps spécifiques ; chaque animal reçoit 10⁴ UFP.

Des échantillons de sang sont prélevés à la veine cave antérieure à divers temps après la vaccination :

— à trois semaines pour les porcs 149 et 150 ;

— à plus de deux mois pour les porcs 610-42-87.

Le porc 3152 a été éprouvé (deux mois après la vaccination à l'aide de la souche « Alfort » injectée par voie intramusculaire (10⁷ U.F.P./porc). Le prélèvement de sang est effectué quinze jours après l'épreuve virulente subie par l'animal en toute impunité.

4° *Séroneutralisation*4. 1. *Méthodes employées.*4. 1.1. *Méthode à « virus variable et sérum constant ».*

On prépare des suspensions virales contenant des concentrations décroissantes de particules infectieuses. A un volume déterminé de chacune des suspensions, on ajoute un volume égal d'une dilution fixe de sérum. Après incubation pendant une heure à 37°C, on prélève 3 aliquots, par concentration de virus utilisée, pour déterminer par la méthode des plages le titre infectieux viral après séroneutralisation. L'index de neutralisation représente la différence du logarithme des titres infectieux observés avant (V₀) et après (V_r) la réaction de neutralisation

$$IN = \log V_0 - \log V_r$$

4. 12. *Méthode à « virus constant et sérum variable ».*

A un nombre prédéterminé de particules virales infectieuses (de 200 à 300) on ajoute des dilutions croissantes de sérum. Après homogénéisation les mélanges sont portés à 37°C pendant une heure, puis on détermine par titrage le nombre d'unités formant des plages restant après neutralisation. Le couple virus-sérum est caractérisé par la dilution de sérum conduisant à une perte de 50 p. 100 du pouvoir infectieux. Cette dilution est déterminée graphiquement.

4. 13. *Cinétiques de neutralisation.*

Au temps zéro 0,1 ml de sérum à la dilution appropriée est ajouté à 1,9 ml de suspension virale. Le virus et le sérum préchauffés sont maintenus au bain-marie à une température de 37°C. A des temps déterminés, 0,2 ml de mélange sont prélevés, dilués aussitôt au 1/10 dans du milieu M.E.M. refroidi contenant 2 p. 100 de sérum de veau embryonnaire, et conservés dans la glace fondante.

Les échantillons sont ensuite dilués afin de déterminer par la méthode des plages le titre infectieux résiduel.

4. 2. *Théorie mathématique de la séroneutralisation.*

Très schématiquement, la réaction entre le virus et les anticorps peut s'écrire de la façon suivante :



où

V = Virus A = anticorps n = constante

D'après la loi d'action de masse, la constante d'équilibre de la réaction (K) est égale à

$$K = \frac{[VAn]}{[V_i] \cdot [A_i]^n} \quad (a)$$

où

$[V_i]$ = concentration de virus libre = V_r
 $[VAn]$ = concentration de virus neutralisé = $V_0 - V_r$
 $[A_i]$ = concentration en anticorps libre = concentration totale en anticorps (voir § 2 des résultats) = C/D

où C = constante et D = dilution de la solution.

La relation (a) peut s'écrire $\log\left(K \times \frac{C^n}{D^n}\right) = \log\left(\frac{V_0 - V_r}{V_r}\right)$.

L'expression $\log\left(\frac{V_0 - V_r}{V_r}\right)$ est assimilable à $\log\frac{V_0}{V_r}$ (c'est-à-dire à l'I.N.) lorsque $V_0 \gg V_r$ d'où :

$$\log K + n \log C - n \log D = \text{IN}$$

puisque

$$\log K + n \log C = \text{constante} = \text{IN}_0$$

nous obtenons

$$\text{IN} = \text{IN}_0 - n \log D \quad (1)$$

RÉSULTATS

1° *Caractéristiques de la réaction de neutralisation du virus de la Peste porcine par les anticorps spécifiques*

1. 1. *Cinétiques de neutralisation du virus de la Peste porcine.*

L'étude de la cinétique de la réaction virus-anticorps permet de déterminer si la mesure de l'I.N. est effectuée au moment où celle-ci atteint l'équilibre.

Les courbes de la figure 1 représentent les cinétiques de neutralisation du virus de la Peste porcine par différentes dilutions du sérum de porc n° 3152, spécifique de la souche « Thiverval ». Pour chaque temps d'incubation à 37°C. du mélange réactionnel (30 mn, 60 mn, et 120 mn), l'intensité de la diminution du pouvoir infectieux est fonction de la dilution de sérum utilisée. L'équilibre de la réaction est atteint

plus rapidement lorsque la perte de pouvoir infectieux est forte (60 mn pour une diminution de 5 logarithmes) que lorsqu'elle est faible (120 mn pour une diminution de 1,5 logarithme).

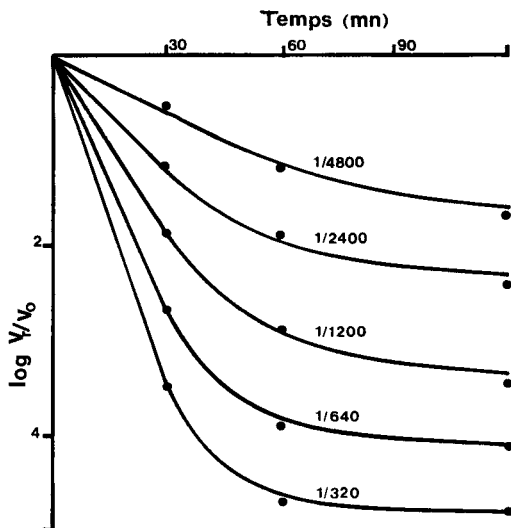


FIG. 1. — Cinétique de neutralisation du virus de la Peste porcine par différentes dilutions de l'antisérum de porc n° 3152
L'expression $\log V_r/V_0$ indique la perte du pouvoir infectieux à la suite de la réaction de neutralisation

TABLEAU I
Étude de l'influence
sur l'I.N. de la concentration initiale de virus (V_0) utilisée lors de la mesure

Dilution finale de la suspension virale	V_0	V_r	I.N. = $\log V_0/V_r$
1/200	$2,2 \times 10^4$ ⁽¹⁾	48-47-87	2,5
1/20	$2,2 \times 10^5$ ⁽¹⁾	1 200-800-800	2,3
1/2	$2,2 \times 10^6$ ⁽¹⁾	$\geq 5\ 000 - \geq 5\ 000 - \geq 5\ 000$	$\leq 2,6$

⁽¹⁾ Déterminé en utilisant une dilution 1/2 000 de la suspension virale initiale (nombre de plages par tube = 1 200-2 800-2 600 ; nombre moyen : $2,2 \cdot 10^3$ plages par tube).

V_r = nombre de particules infectieuses déterminé après 1 heure d'incubation à 37°C du mélange réactionnel constitué de :

- V_0 particules virales ;
- le sérum de porc numéro 3152 dilué au 1/1 200 final.

I. 2. Présence d'un excès d'anticorps neutralisants dans le mélange réactionnel.

L'étude de la dépendance de la perte du pouvoir viral vis-à-vis de la concentration de virus utilisée dans le test, permet de déterminer si la réaction de neutralisation est réalisée en présence d'un excès d'anticorps neutralisants. Pour cela il faut pouvoir déterminer l'I.N. d'un antisérum donné, à l'aide de différentes concen-

trations de suspensions virales. Cette expérience est possible car, pour le virus de la Peste porcine, on peut dénombrer un maximum de 3 000 unités formant des plages sur une lamelle de tube de Leighton selon une technique d'échantillonnage déjà décrite (AYNAUD *et al.*, 1972). Dans nos conditions expérimentales, l'utilisation de concentrations de virus variant dans un rapport de 1 à 100 influe peu sur la valeur de l'I.N. (tableau 1). La réaction de neutralisation peut donc être considérée comme réalisée en présence d'un excès d'anticorps. Dans les équations découlant de la loi d'action de masse nous pourrions assimiler la concentration en anticorps libre à la concentration totale en anticorps.

2° *Influence de la dilution d'antisérum sur la mesure de l'index de neutralisation*

2. 1. *Étude des sérums prélevés en début d'immunisation.*

La neutralisation en culture cellulaire du virus de la Peste porcine a permis de déterminer l'I.N. correspondant à chaque dilution de deux sérums (149 et 150) prélevés sur des porcs vaccinés depuis trois semaines avec la souche « Thiverval ».

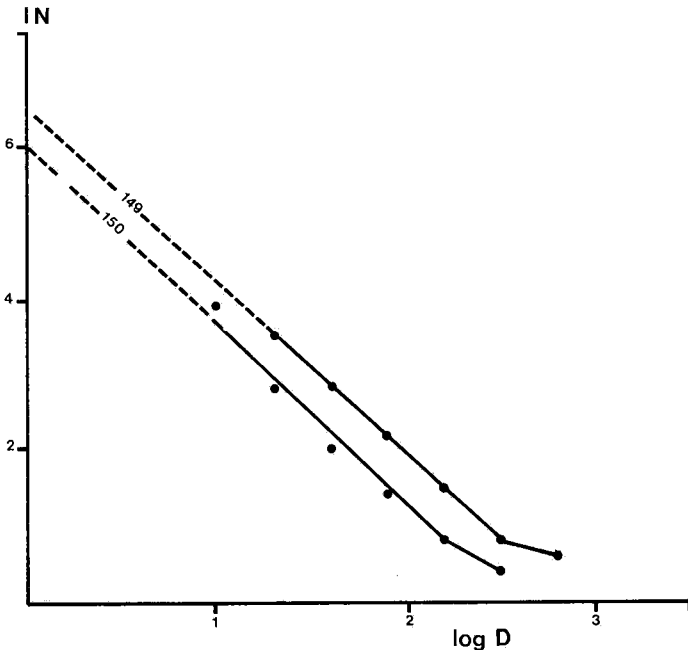


FIG. 2. — Relation entre l'index de neutralisation (I.N.) et le logarithme de la dilution (log D) du sérum employé pour la détermination de cet index : étude de 2 sérums prélevés sur des porcs vaccinés contre la Peste porcine depuis trois semaines (149-150)

La figure 2 représente les variations de l'I.N. en fonction du logarithme de la dilution de sérum. La relation linéaire observée entre les deux variables est : $IN = IN_0 - K \log D$ où K est la pente de la droite, D la dilution du sérum et IN_0 la valeur de l'I.N. obtenue par extrapolation pour une valeur de D égale à 1 ($\log D = 0$). Les valeurs des paramètres de cette droite sont voisines pour les deux sérums étudiés (tableau 2). La valeur moyenne de K est égale à 2,35. Si l'I.N. devient inférieur à un, on observe un léger écart à la linéarité.

TABLEAU 2
Étude des paramètres de la droite ($IN = IN_0 - K \log D$)

Nature de l'échantillon	N°	Paramètres de la droite $IN = IN_0 - K \log D$			
		K	K moyen	IN_0	
Sérums de porcs prélevés en début d'immunisation	149	2,3	} 2,35	6,5	
	150	2,4		6	
Sérums de porcs prélevés en fin d'immunisation	42	3,6	} 3,2	9,3	
	87	3,4		} 2,9	9,7
	610	3,4			9
	3152	3,2			} 13
	—	3,3			
	—	3,5			
—	2,9				
Ig G purifiées à partir du sérum 3152		2,3	} 2,35	7	
		2,4			

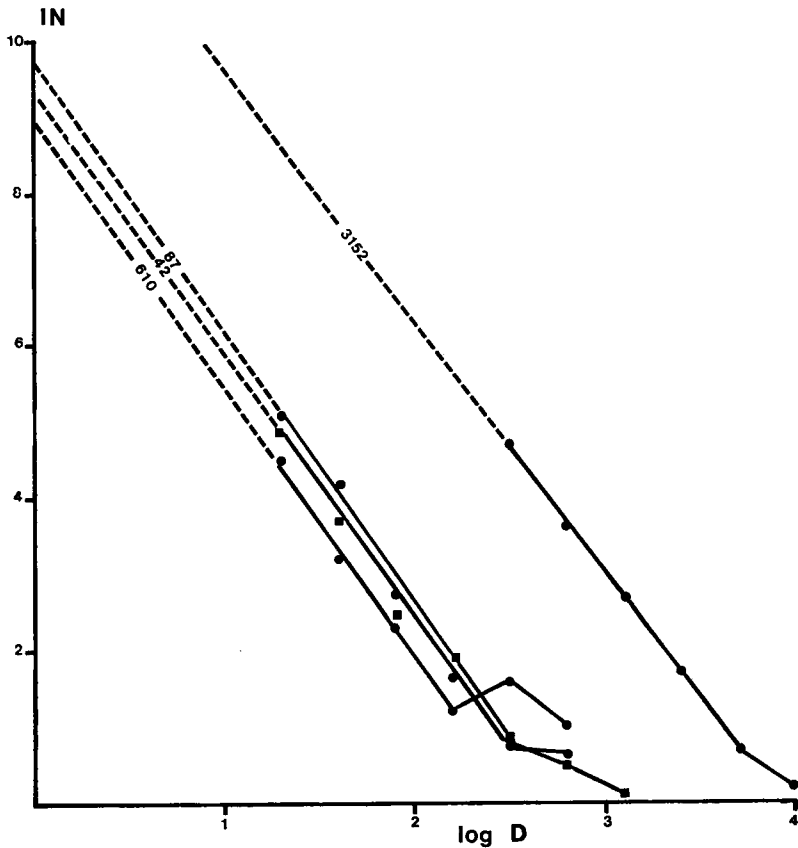


FIG. 3. — Relation entre l'index de neutralisation (I.N.) et le logarithme de la dilution ($\log D$) du sérum employé pour la détermination de cet index : étude de 3 sérums prélevés sur des porcs vaccinés contre la Peste porcine depuis plus de deux mois (610-42-87) et d'un sérum de porc vacciné avec la souche « Thiverval » et éprouvé à l'aide d'une souche virulente (3152).

2. 2. *Étude des sérums prélevés en fin d'immunisation.*

La relation entre l'I.N. et le logarithme de la dilution d'anticorps a été déterminée pour trois sérums prélevés sur des porcs (610, 42 et 87) vaccinés depuis plus de deux mois avec la souche « Thiverval ». Cette relation est linéaire et la pente moyenne des droites est égale à 3, 4 (fig. 3 et tableau 2).

L'étude du sérum 3152 d'un porc vacciné avec la souche atténuée « Thiverval » et éprouvé avec la souche « Alfort » montre que la mesure de K est reproductible d'une expérience à l'autre et comparable aux valeurs obtenues précédemment (fig. 3 et tabl. 2).

2. 3. *Étude des IgG purifiées à partir du sérum 3152.*

Les IgG du sérum 3152 ont été purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur échangeurs d'ions. Ces IgG ont une intense activité antivirale de la Peste porcine. L'I.N. est une fonction linéaire du logarithme de la dilution de la solution d'IgG utilisée pour la mesure. La pente de la droite K est égale à 2,35 (tableau 2).

TABLEAU 3
Comparaison de méthodes de séroneutralisation
à « sérum constant » (I.N.) et à « sérum variable » (D_{50})

D_{50} : dilution de sérum inhibant 50 p. 100 du pouvoir infectieux

I.N. : index de neutralisation

d : dilution de sérum employée pour la mesure de l'index de neutralisation

Séroneutralisation		Mesure expérimentale de la D_{50}		Calcul de la D_{50} par la méthode de l'I.N.			Écart entre $\log D_{50}$ mesurée et $\log D_{50}$ calculée	
Spécificité du sérum	Souche de virus utilisée dans le test	D_{50} (1)	$\log D_{50}$	I.N.	d	$\log D_{50}$ calculée (2)		
Anti-souches « Alfort » ou « Thiverval »	Souche « Alfort »	160	2,2	2,7	1/20	2,1	+ 0,1	
		1 600	3,2	4,2	1/20	2,6	+ 0,6	
		2 800	3,4	4,2	1/10	2,6	+ 0,8	
		28 000	4,5	}	5,2	1/200	4	+ 0,5
					3,4	1/1600	4,2	+ 0,3
	Souche « Thiverval »	20 000	4,3	3,5	1/1 600	4,3	0	
	Souche « 331 »	2 500	3,4	}	4,5	1/20	2,7	+ 0,7
					1	1/200	2,6	+ 0,8
					1,7	1/20	1,8	+ 0,1
					2,8	1/20	2,1	+ 0,1
1					1/1600	3,4	- 0,1	
Anti-souches « 331 » ou « Loud »	Souche « Alfort »	1 000	3	1,8	1/800	3,3	- 0,3	
	Souche « 331 »	120	2,1	2,1	1/20	1,9	+ 0,2	
		80	1,9	1,5	1/20	1,7	+ 0,2	
		16 000	4,2	}	3,2	1/800	3,8	+ 0,4

(1) D'après AYNAUD *et al.*, 1974 ; CORTIER *et al.*, 1974 et des résultats non publiés.

(2) Le calcul théorique de $\log D_{50}$ est réalisé d'après la formule : $\log D_{50} = 1/3 (\text{IN}d - 0,3 + 3 \log d)$.

3° *Comparaison des méthodes de séroneutralisation
à sérum « constant » et à « sérum variable »*

Une perte de 50 p. 100 du pouvoir infectieux viral correspond à une concentration du virus encore infectieux après neutralisation égale à la moitié de celle du virus initiale ($V_0 = 2 V_r$) donc à un I.N. égal à $\log 2$ soit 0,3. Si IN_a représente l'I.N. observé à la dilution d , et si D_{50} représente la dilution de sérum inhibant 50 p. 100 du pouvoir infectieux ; nous avons :

$$\begin{aligned} IN_a &= IN_0 - 3 \log d. \\ 0,3 &= IN_0 - 3 \log D_{50}. \end{aligned}$$

d'où l'on tire : $\log D_{50} = 1/3 (IN_a - 0,3 + 3 \log d)$.

A partir des valeurs de l'IN on possède un moyen pour calculer la D_{50} . Le tableau 3 représente le calcul théorique de la D_{50} et la comparaison des valeurs obtenues avec les résultats expérimentaux. La régression obtenue entre les deux séries D_{50} mesurée et D_{50} calculée est :

$$D_{50} m = 0,98 D_{50} c + 0,36$$

avec un coefficient de corrélation $r = 0,9353$ ($P < 0,001$) ; l'erreur maximale réalisée en prenant pour D_{50} mesurée la valeur calculée sera donc de 20 p. 100 (avec une sécurité de 95 p. 100), les chiffres obtenus étant en moyenne sous-estimés de 0,3 unité.

DISCUSSION

Notre discussion portera sur les points suivants :

- 1° Influence de la quantité d'anticorps sur la valeur de l'index de neutralisation.
- 2° Facteurs de variabilité des paramètres de la droite $IN = IN_0 - K \log D$.
- 3° Comparaison des deux méthodes de séroneutralisation à « sérum constant » et à « sérum variable ».

1° *Influence de la quantité d'anticorps sur la valeur de l'index de neutralisation*

Sur la base des études théoriques réalisées sur la neutralisation d'autres virus animaux (DULBECCO, VOGT, STRICKLAND, 1956 ; FAZEKAS DE SAINT GROTH, WATSON et REID, 1958 ; FAZEKAS DE SAINT GROTH et WEBSTER, 1963 *a* et *b*) la réaction entre le virus de la Peste porcine et les anticorps spécifiques peut être considérée comme régie par la loi d'action de masse puisque :

1° la relation virus-anticorps atteint un équilibre, fonction des concentrations des réactifs en présence, qui se maintient au cours du temps. On peut considérer que cet équilibre est atteint après une heure à 37°C, à l'exception des concentrations d'anticorps faibles (I.N. = 1,5) pour lesquelles l'équilibre est atteint en deux heures (fig. 1).

2° La proportion de particules infectieuses non neutralisées est inversement proportionnelle à la concentration des anticorps présents dans le sérum (fig. 1).

D'autre part la réaction est réalisée en présence d'un excès d'anticorps puisque la proportion de particules infectieuses non neutralisées, et par conséquent l'I.N., sont indépendants de la concentration absolue de virus utilisé (tableau 1).

En assimilant la concentration en anticorps libres à la concentration totale d'anticorps, on obtient à partir de la loi d'action de masse l'équation suivante

$$\log \left(\frac{V_0 - V_r}{V_r} \right) = IN_0 - K \log D \text{ (voir matériel et méthodes).}$$

Cette réaction est semblable à celle décrite par BURNET (1960).

En assimilant, lorsque $V_0 \gg V_r$, l'expression

$$\log \left(\frac{V_0 - V_r}{V_r} \right) \text{ à } \log \frac{V_0}{V_r}$$

c'est-à-dire à l'I.N. on obtient :

$$IN = IN_0 - K \log D \quad (1)$$

Les résultats expérimentaux sont compatibles avec notre hypothèse de départ puisqu'il existe une relation linéaire entre l'I.N. et le logarithme de la dilution (fig. 2 et 3).

Une relation semblable a été mise en évidence pour d'autres togavirus (WESTAWAY, 1965 *a* et *b*, WAY et GARWES, 1970), la fièvre aphteuse (BRADISH, FARLEY et FERRIER, 1962) et la rage (WIKTOR et CLARK, 1973). Les études de FAZEKAS DE SAINT GROTH et WEBSTER *a*, 1963) suggèrent cependant que, pour le virus grippal tout au moins, l'expression (1) n'est qu'une approximation valable pour une zone restreinte de dilutions et que la relation entre l'I.N. et le logarithme de la dilution serait en fait sigmoïdale. L'écart à la linéarité observé pour les faibles valeurs de l'I.N. pourrait être interprété dans ce sens.

Cependant, WESTAWAY (1965 *b*) lors de l'étude de la neutralisation des togavirus, propose une autre explication. L'expression $\log V_0/V_r$ est une simplification. La formulation exacte, $\log (V_0 - V_r/V_r)$, devient significativement différente de la précédente quand $\log V_0/V_r$ est égale à un. Lorsque cet auteur applique cette correction, il n'observe plus d'écart à la linéarité. Le traitement de nos résultats dans ce sens, ne supprime cependant pas complètement l'absence de linéarité observée pour les valeurs de l'I.N. inférieures à un. Une seconde hypothèse peut être évoquée, lorsque l'I.N. est inférieur à un, la réaction n'est plus réalisée en excès d'anticorps et la formule (1) n'est plus exacte.

2° Facteurs de variabilité de la droite ($IN = IN_0 - K \log D$)

La valeur IN_0 obtenue par extrapolation de la droite pour une dilution égale à un est fonction de la quantité d'anticorps antiviral de la Peste porcine présente dans le sérum. Il n'en est pas de même pour la valeur de la pente K de cette droite : lorsqu'on utilise des sérums de porcs en début d'immunisation (c'est-à-dire des sérums où l'activité anticorps est portée plus par les IgM que par les IgG), la pente K est légèrement inférieure à celle des sérums de porcs en fin d'immunisation où l'activité neutralisante est due essentiellement aux IgG. Il semble donc que la pente K de la droite $IN = IN_0 - K \log D$ varie légèrement en fonction de la classe d'immunoglobulines portant l'activité anticorps. Cette caractéristique a également été observée par WESTAWAY en 1965 *b* lors de l'étude d'autres togavirus. Nous utiliserons la valeur 3 comme valeur moyenne de la pente K , pour comparer les deux méthodes de séronéutralisation.

3° *Comparaison des méthodes de séroneutralisation à « sérum constant » et à « sérum variable »*

La dilution de sérum inhibant 50 p. 100 du pouvoir infectieux viral D_{50} peut être obtenue soit par une mesure directe, à l'aide de la méthode à « sérum variable », soit par un calcul à partir de l'I.N. déterminé à la dilution D en utilisant la formule : $\log D_{50} = 1/3 (IN - 0,3 + 3 \log D)$. Les valeurs déterminées par le calcul sont le plus souvent (10 sérums sur 13) légèrement inférieures aux valeurs expérimentales (en moyenne de 0,3 unités). Ceci est dû au fait que la formule employée est établie en considérant que la relation entre l'I.N et $\log D$ est linéaire quelque soit $\log D$, ce qui n'est vraiment vérifié que pour les valeurs de l'I.N supérieures à un. Cependant l'écart entre le logarithme des deux dilutions 50 p. 100 est faible (inférieur à 0,3), c'est-à-dire de l'ordre de l'imprécision expérimentale. Ces deux méthodes de séroneutralisation peuvent donc être utilisées également pour déterminer la dilution de sérum inhibant 50 p. 100 du pouvoir infectieux viral.

Le choix de l'une ou l'autre des méthodes de séroneutralisation ne dépend donc que de considérations pratiques. En particulier le nombre de tubes de culture cellulaires (LEIGHTON) doit être pris en compte. En effet le pouvoir infectieux du virus de la Peste porcine est déterminé par les techniques d'immunofluorescence. De ce fait, la lecture des résultats s'avère fastidieuse en raison des contraintes propres à cette technique.

Reçu pour publication en août 1976.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier MM. J. M. AYNAUD et A. ZACHOWSKI pour leur aide et leurs conseils dans la rédaction de cet article.

SUMMARY

COMPARISON OF TWO « IN VITRO » METHODS FOR TITRATION OF SWINE FEVER VIRUS NEUTRALIZING ANTIBODIES

Swine fever virus neutralization have been studied by the following method : variable plaque forming units numbers are mixed with a predetermined serum dilution. Infectivity is measured before (V_0) and after (V_1) neutralization reaction. Neutralization index (N.I. = $\log V_0/V_1$) represent the difference between the two titers.

It had been demonstrated that mass law is a good approximation to describe swine fever virus neutralization. So the most useful form in which to express the relation between N.I. and dilution logarithm ($\log D$) is $NI = NI_0 - K \log D$ (1) where K is the constante corresponding to the slope of neutralization curve. A slight K variation is observed according to immunoglobulin classes sharing antibody activity. Average K value is equal to 3. NI_0 is the NI obtained when extrapolating the curve to $\log D = 0$.

These results have permitted to compare the two seroneutralization methods commonly used : « constant serum » method and « variable serum » method (determination of serum dilution inhibiting 50 % of infectivity : D_{50}).

From formula (1) the following relation can be obtained :

$$\log D_{50} = 1/3 (NI - 0,3 + 3 \log D).$$

Theoretical and experimental $\log D_{50}$ values were approximatively the same (difference inferior or equal to 0.3). So D_{50} can be calculated by both methods.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AYNAUD J. M., 1968. Étude de la multiplication *in vitro* d'un clone du virus de la Peste porcine. *Rech. vétér.* **1**, 25-36.
- AYNAUD J. M., BIBARD C., 1971. Bilan de l'apport des techniques d'immunofluorescence dans le domaine de la Peste porcine classique. *Cah. Méd. Vétér.*, **5**, 1.
- AYNAUD J. M., GALICHER C., LOMBARD J., BIBARD C., MIERZEJEWSKA M., 1972. Peste porcine classique : les facteurs d'identification *in vitro* (marqueurs génétiques) du virus en relation avec le pouvoir pathogène pour le Porc. *Ann. Rech. vétér.*, **3**, 209-235.
- AYNAUD J. M., RIGAUD C., LE TURDU Y., GALICHER G., LOMBARD J., CORTIER G., LAUDE H., 1974. Peste porcine classique. Les variations sérologiques du virus en France et leur rôle dans l'évolution de la maladie sous sa forme sub-clinique ou chronique sur le terrain. *Ann. Rech. vétér.*, **5**, 57-87.
- BRADISH C. J., FARLEY J. O., FERRIER H. E. N., 1962. Studies of the nature of the neutralization reaction and the competition for neutralizing antibody between components of the virus system of foot and mouth disease. *Virology*, **18**, 378.
- BURNET F. M., 1960. *Principles of animal virology*. Academic Press, New York and London.
- CORTIER G., AYNAUD J.-M., GALICHER C., GELFI J., 1974. Activité antigénique comparée de deux togavirus : le virus de la Peste porcine et le virus de la Maladie des muqueuses. *Ann. Rech. vétér.* **5**, 373-393.
- DULBECCO R., VOGT M., STRICKLAND A. G. R., 1956. A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, Western Equine Encephalitis virus and Poliomyelitis virus. *Virology*, **2**, 162.
- FAZEKAS DE SAINT-GROTH S., WATSON G. S., REID A. F., 1958. The neutralization of animal viruses. I. A model of virus-antibody interaction. *J. Immunol.* **80**, 215.
- FAZEKAS DE SAINT-GROTH S., WEBSTER R. G., 1963 a. The neutralization of animal viruses. III. Equilibrium conditions in the influenza virus antibody system. *J. Immunol.*, **90**, 140.
- FAZEKAS DE SAINT-GROTH S., WEBSTER R. G., 1963 b. The neutralization of animal viruses. IV. Parameters of the influenza virus-antibody system. *J. Immunol.*, **90**, 151.
- HECKE F., 1967. Die Quantitative Beziehung zwischen Viruskonzentration und Serumverdünnung bei der Virus-neutralisation Untersucht bei Teschenvirus Mittels röhrengew ebekulturen im Hirnlick auf grundsätzliche und praktische Probleme. *Ztbl. Bakt. Parasitenkunde Infekt. Krankheit. und Hyg.*, **1**, Orig., **203**, S 422.
- HYLLSETH B., PETTERSSON U., 1970. Neutralization of Equine Arteritis virus ; enhancing effect of guinea pig serum. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **32**, 337.
- LAFFERTY K. J., 1963 a. The interaction between virus and antibody. I. Kinetics studies. *Virology*, **21**, 61.
- LAFFERTY K. J., 1963 b. The interaction between virus and antibody. II. Mechanism of reaction. *Virology*, **21**, 76.
- LAFFERTY K. J., OERTELIS S., 1963. The interaction between virus and antibody. III. Examination of virus-antibody complexes with electron microscope. *Virology*, **21**, 91.
- MANDEL B., 1961. Reversibility of reaction between poliovirus and neutralizing antibody of rabbit origin. *Virology*, **14**, 316.
- MANDEL B., 1967 a. The interaction of neutralized poliovirus with hela cells. I. Adsorption. *Virology*, **31**, 238.
- MANDEL B., 1967 b. The interaction of neutralized poliovirus with hela cells. II. Elution, penetration, uncoating. *Virology*, **31**, 248.
- MENGELING W. L., PACKER R. A., 1969. Pathogenesis of chronic hog cholera : host response. *Amer. J. Vet. Res.*, **30**, 409.
- PIRTLE E. C., MENGELING W. L., 1971. Antigenic difference in two Hog cholera virus strains. *Amer. J. Vet. Res.*, **32**.
- POULAIN J., GOURREAU J. M., DAUTIGNY A., 1972. Ecthyma contagieux du mouton : anticorps sériques neutralisants. *Ann. Rech. vétér.*, **3**, 571-579.
- RADWAN A. I., BURGER D., 1973 a. The role of sensitizing antibody in the neutralization of equine arteritis virus by complement and anti IgG serum. *Virology*, **53**, 366.
- RADWAN A. I., BURGER D., 1973 b. The complement requiring neutralization of equine arteritis virus by late antisera. *Virology*, **51**, 71.
- WALLIS C., MELNICK J. L., 1971. Herpes virus neutralization. The role of complement. *J. Immunol.*, **107**, 1235.
- WAY H. J., GARWES D. J., 1970. Serum accessory factors in the measurement of arbovirus neutralization reaction. *J. Gen. Virol.*, **7**, 211.
- WESTAWAY E. G., 1965 a. The neutralization of arboviruses. I. Neutralization in homologous virus-serum mixtures with two group B arboviruses. *Virology*, **26**, 517.
- WESTAWAY E. G., 1965 b. The neutralization of Arboviruses. II. Neutralization in heterologous virus-serum mixtures with four group B Arboviruses. *Virology*, **26**, 528.
- WIKTOR T. J., CLARK H. F., 1973. Application of the plaque assay technique to the study of rabies virus-neutralizing antibody interactions. *Ann. Microbiol.*, **124**, 271.
- WITTMANN G., BARTENBACH G., JAKUBIK J., 1976. Cell-mediated immunity in Aujeszky Disease Virus. I. Lymphocyte stimulation. *Arch. Virol.*, **50**, 215.