

**GUIDE POUR L'ISOLEMENT
DES POLIOVIRUS ET L'APPLICATION
DE TECHNIQUES SÉROLOGIQUES
AUX FINS DE
LA SURVEILLANCE DE LA POLIOMYÉLITE**

I. DÖMÖK

*Chef de la Division d'Epidémiologie et de Microbiologie
Institut national d'Hygiène
Budapest, Hongrie*

et

D. I. MAGRATH

*Division of Viral Products
National Institute for Biological Standards and Control
Londres, Angleterre*



**ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ
GENÈVE
1979**

Publication offset No 46

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction	5
1. Lutte contre la poliomyélite : rôle des laboratoires de santé publique	5
1.1 Planification	5
1.2 Contrôle de la qualité des vaccins	6
1.3 Impact de la vaccination	6
1.4 Etude des cas individuels et des petites poussées épidémiques	7
1.5 Enquêtes sérologiques	7
1.6 Isolement des poliovirus et titrage des anticorps neutralisants dans le sérum	8
2. Isolement du poliovirus	9
2.1 Collecte des échantillons	9
2.2 Transport et conservation	11
2.3 Préparation du matériel	11
2.4 Isolement du virus	12
2.5 Identification des isolements de poliovirus ..	13
2.6 Evaluation des résultats	16
3. Titrage des anticorps neutralisants	17
3.1 Echantillons de sérum	17
3.2 Réactifs et cultures cellulaires	17
3.3 Matériel spécial	18
3.4 Mode opératoire	18
3.5 Evaluation des résultats	19

	Pages
Annexe 1 Composition des milieux	21
Annexe 2 Préparation des suspensions virales stocks ...	22
Annexe 3 Culture de cellules Hep-2 (Cincinnati) en flacons	22
Annexe 4 Conservation d'une banque de cellules Hep-2 dans l'azote liquide	24
Annexe 5 Diluant pour sérum et virus	26

INTRODUCTION

La poliomyélite est l'une des six maladies contre lesquelles l'OMS a décidé de lutter en priorité dans le cadre de son programme élargi de vaccination. L'expérience de nombreux pays montre que l'incidence des formes paralytiques tombe rapidement à un faible niveau après la mise en oeuvre de programmes efficaces de vaccination. Ce déclin du taux d'incidence peut servir d'indicateur des progrès réalisés dans la protection des enfants sensibles à l'infection poliomyélitique.

1. LUTTE CONTRE LA POLIOMYELITE : ROLE DES LABORATOIRES DE SANTE PUBLIQUE

1.1 Planification

Avant d'entreprendre une campagne contre la maladie, il faut que les autorités nationales déterminent l'ampleur du problème à combattre. Pour la poliomyélite, on peut à cette fin effectuer des enquêtes rétrospectives sur les séquelles paralytiques observées chez les enfants ayant dépassé l'âge habituel de sensibilité à la poliomyélite. Cette technique, qui a été appliquée au Ghana par Nicholas et al.,¹ est de plus en plus utilisée dans d'autres pays. Après avoir déterminé le taux global de paralysies et l'âge au-dessous duquel la plupart des enfants ont contracté leur paralysie, il est possible de formuler des recommandations générales sur la nécessité d'inclure ou non la poliomyélite dans le programme national de lutte contre la maladie.

Pour compléter les renseignements fournis par les enquêtes rétrospectives, le laboratoire de santé publique peut procéder à des enquêtes sérologiques afin de déterminer avec plus de précision les taux d'infection en fonction de l'âge pour chacun des trois types de poliovirus et d'isoler les types de virus en circulation. Il est important que le laboratoire de santé publique participe dès le début au programme de lutte et aide à confirmer le diagnostic et à notifier les cas qui se produisent dans la mesure où c'est le système de notification qui fournit les premiers indices du succès ou de l'échec d'un programme. Les prélèvements effectués sur les cas cliniques devraient être systématiquement contrôlés par le laboratoire pour confirmation du diagnostic et, en cas de résultats non concordants, le laboratoire

¹Nicholas, D. D. et al. (1977) British medical Journal, 1, 1009.

et les cliniciens devraient chercher à améliorer ensemble les critères de diagnostic et les méthodes appliquées à la collecte des échantillons.

1.2 Contrôle de la qualité des vaccins

Dans le cadre de son programme élargi de vaccination, l'OMS encourage vivement le contrôle de la qualité des vaccins dans le pays où ils sont utilisés. Cette opération peut se réduire, dans une première étape, à lire et interpréter les protocoles de production soumis par les fabricants nationaux ou étrangers. Il est cependant souhaitable de créer des laboratoires nationaux capables de contrôler l'activité¹ et la stérilité² des vaccins utilisés. Un laboratoire ainsi équipé sera également en mesure de participer à une évaluation continue de l'efficacité de la chaîne du froid, de manière à garantir l'activité des vaccins tout au long du circuit de distribution. Il devient possible de contrôler des échantillons de vaccins dès que l'on soupçonne une interruption importante dans la chaîne du froid. Des contrôles systématiques peuvent également être effectués en différents points du réseau de distribution.

1.3 Impact de la vaccination

L'impact de la vaccination doit être évalué d'après la diminution du taux d'incidence plutôt que d'après le nombre de séro-conversions; en conséquence, l'accent sera mis essentiellement sur la surveillance de la maladie qui fait notamment intervenir des enquêtes sur les séquelles paralytiques.

Toutefois, l'étude des titres d'anticorps antipoliiovirus chez les enfants dont on sait ou l'on pense qu'ils ont été vaccinés permet de dépister précocement un éventuel début

¹ Des épreuves d'activité concernant le vaccin antipoliomyélitique sont décrites dans les Normes N° 7 pour les Substances biologiques, Révision 1971 (OMS, Série de Rapports techniques, N° 486, 1972, p. 21). Cela dit, l'OMS a récemment organisé une étude collective des méthodes de titrage et est en mesure de fournir sur demande des conseils plus détaillés.

² Des épreuves de stérilité sont décrites dans les Normes N° 6 pour les Substances biologiques, Révision 1973 (OMS, Série de Rapports techniques, N° 530, 1973, p. 42). Conformément aux indications données à la section 5 de ces Normes, on contrôlera au moins 20 échantillons recueillis dans les récipients définitifs du vaccin.

d'épidémie et de donner ainsi aux autorités nationales le temps de prendre les mesures de prévention nécessaires.

1.4 Etude des cas individuels et des petites poussées épidémiques

A mesure que les programmes de vaccination gagnent en efficacité dans un pays, il faut accorder une attention accrue à l'étude des cas isolés et des petites poussées. On procédera pour cela à des analyses épidémiologiques approfondies complétées par des examens sérologiques et l'isolement des virus au laboratoire afin de confirmer que la maladie en question est bien la poliomyélite, d'identifier les facteurs de risque ayant vraisemblablement provoqué le cas ou la poussée décelés, et de recommander des mesures propres à empêcher la propagation de la maladie.

Il est possible d'enrayer une épidémie de poliomyélite par l'administration d'un vaccin monovalent du type approprié mais la vaccination ne doit en aucun cas être retardée dans l'attente des résultats du laboratoire. En cas de doute, on administrera un vaccin trivalent. La rapidité avec laquelle la poliomyélite est endiguée dans un pays dépend de la compétence des administrations et des services techniques responsables.

1.5 Enquêtes sérologiques

Elles exigent des prélèvements de sérum dans les divers groupes sociaux et les collectivités tant urbaines que rurales.

Les sérums doivent être prélevés très vite afin d'éviter que des infections intercurrentes ne risquent de fausser les résultats. Cela dit, les examens de laboratoire sur les sérums ainsi prélevés pourront s'étendre sur plusieurs semaines. Deux techniciens compétents sont capables de procéder dans 50 sérums en une semaine au titrage des anticorps neutralisants à l'égard des trois types de poliovirus. Dans les cas où il serait difficile d'effectuer des titrages sur les trois types de virus, il serait essentiel de chercher à déterminer la proportion d'enfants démunis d'anticorps à l'égard du poliovirus de type 1 puis celle des enfants ne présentant pas d'anticorps à l'égard des trois types de virus.

Il est recommandé de prélever les échantillons de sérum sur des enfants de moins de cinq ans, répartis entre les groupes d'âge suivants :

<u>Age</u>	<u>Nombre d'échantillons nécessaire</u>
6-11 mois	50
12-23 mois	100
24-35 mois	100
35-59 mois	50

Ces chiffres représentent le minimum en deçà duquel les échantillons ne seraient pas assez nombreux pour fournir des renseignements utiles.

Les résultats de telles enquêtes sérologiques permettront, avec les renseignements fournis par l'étude des cas de séquelles paralytiques, de définir quels sont les groupes d'âge pour lesquels la vaccination s'impose le plus.

Il est inutile de continuer à analyser les titres d'anticorps neutralisants après le lancement des programmes de vaccination, à moins que l'on ait des raisons de penser que le vaccin ne confère pas la protection voulue. En pareil cas, l'essentiel est de procéder à une enquête complète sur tous les cas de paralysie et les circonstances épidémiologiques dans lesquelles ils se sont produits afin de confirmer que le poliovirus en est bien responsable.

Certains cas de poliomyélite peuvent quelquefois paraître liés à l'administration du vaccin; l'OMS est alors en mesure de donner des conseils sur les recherches à entreprendre.

1.6 Isolement des poliovirus et titrage des anticorps neutralisants dans le sérum

L'isolement des virus et la détermination des titres d'anticorps jouent un rôle important dans la surveillance de la poliomyélite.

L'isolement des poliovirus est nécessaire pour : fournir la confirmation étiologique de la suspicion clinique de poliomyélite; déterminer les types de poliovirus responsables de chaque cas de paralysie; détecter le type de poliovirus responsable d'une poussée localisée ou d'une épidémie; mesurer la vitesse de propagation du virus dans certains groupes de population ou dans une zone bien délimitée; et évaluer peut-être l'origine des souches de poliovirus à partir de leurs caractéristiques spécifiques à l'intérieur d'un type donné.

L'isolement du virus à partir d'échantillons d'eaux usées permet de déceler systématiquement la propagation de poliovirus dans la collectivité. Cette méthode est particulièrement utile dans les cas où les échantillons proviennent des effluents d'écoles maternelles et de crèches.

Les prélèvements de selles de malades doivent être exécutés aux premiers stades de la maladie, de préférence dans la semaine suivant l'installation de la paralysie car les chances d'isoler le virus sont alors de 75 %.

Il est nécessaire de rechercher dans le sérum la présence d'anticorps à l'égard du poliovirus pour fournir la confirmation étiologique d'un cas cliniquement suspect par la mise en évidence, au cours de l'évolution de la maladie, d'un titre croissant d'anticorps à l'égard d'un sérotype donné de poliovirus; de déterminer la proportion de sujets de différents groupes d'âge qui présentent ou ne présentent pas d'anticorps antipoliovirus et d'établir, dans certaines circonstances spéciales, les taux de séroconversion consécutive à la vaccination.

Il existe de nombreux procédés pour l'isolement et l'identification des poliovirus ainsi que pour la mise en évidence des anticorps; les méthodes décrites aux sections 2 et 3 sont recommandées à cause de leur relative simplicité.

2. ISOLEMENT DU POLIOVIRUS

2.1 Collecte des échantillons

Prélèvement de selles. Les selles constituent le matériel le mieux adapté à l'isolement des poliovirus. Bien que les malades atteints de poliomyélite excrètent généralement le virus pendant des semaines, c'est à partir d'échantillons recueillis au cours de la phase aiguë que l'isolement du virus est apparemment le plus facile. Etant donné que l'excrétion du virus est parfois intermittente, on accroîtra le taux d'isolement en recueillant deux échantillons de selles à 24-48 heures d'intervalle.

Il y a intérêt à prélever un échantillon de 4 à 8 g, ce qui représente environ la taille d'un pouce d'adulte. L'échantillon doit être placé dans un récipient spécial en verre ou en plastique propre et étanche.

Lorsque l'on ne peut obtenir d'échantillons de selles par la voie habituelle, ce qui peut se produire chez des malades ambulatoires ou dans des cas diagnostiqués sur le terrain, il est possible d'avoir recours à la technique du tubage anal ou à l'écouvillonnage rectal.

Tubage anal. On utilisera à cette fin des tubes de verre ouverts aux deux extrémités, d'environ 5 mm de diamètre et 150 mm de longueur. On arrondira les arêtes en les chauffant à la flamme. Après avoir stérilisé le tube, en boucher une extrémité avec du coton. Lubrifier ensuite l'extrémité non bouchée avec de la paraffine liquide, et l'introduire doucement dans le rectum. De légers mouvements permettent en général d'obtenir une quantité suffisante de selles. Le tube contenant l'échantillon sera ensuite placé dans un tube à essai que l'on bouchera soigneusement.

Écouvillonnage rectal. Introduire assez profondément dans le rectum un tampon stérile imbibé de MTV (milieu de transport pour virus, voir l'annexe 1) et le frotter contre la muqueuse jusqu'à ce que des matières fécales y adhèrent. Retirer ensuite le tampon et le déposer dans un tube à essai contenant 1 à 2 ml de MTV. Dans la mesure où les quantités ainsi obtenues sont beaucoup plus petites que les échantillons de selles recueillis directement, les chances d'isoler le virus peuvent être considérablement réduites.

Matériel nécropsique humain. En cas de décès, il est nécessaire de prélever des fragments de tissu dans le système nerveux central (régions cervicale et lombaire de la moelle épinière, bulbe et protubérance annulaire) ainsi que dans le côlon descendant. Le matériel doit être prélevé dès que possible après le décès, chaque excision étant faite à l'aide d'instruments stériles. Les fragments de tissu nerveux doivent avoir un volume d'environ 1 cm³; au niveau du côlon, on prélève un segment d'environ 5 cm de long, le contenu fécal étant retenu par des ligatures. Chaque échantillon est ensuite déposé séparément dans un flacon stérile fermé par un couvercle à vis et contenant suffisamment de MTV pour que l'échantillon reste immergé.

Etiquetage. Les récipients contenant les échantillons prélevés pour l'isolement du virus doivent porter une étiquette indiquant le nom du malade, le type d'échantillon et la date du prélèvement. Il est nécessaire que l'étiquette reste lisible même mouillée. Les renseignements suivants devraient en outre être communiqués au laboratoire pour tous les échantillons prélevés sur chaque malade : nom, adresse, âge, sexe, antécédents de vaccination antipoliomyélitique (avec des indications détaillées sur le type de vaccin utilisé et les dates des inoculations), diagnostic clinique, date d'apparition des symptômes, type d'échantillon prélevé, date du prélèvement et nom et adresse du clinicien.

2.2 Transport et conservation

Après le prélèvement, les échantillons sont maintenus à la température de 4-8°C et envoyés au laboratoire le plus tôt possible dans une boîte isolante contenant des tampons réfrigérants ou de la glace, la boîte étant elle-même placée dans un sac de plastique fermé. Pour des délais plus longs, il est préférable de congeler les échantillons à une température égale ou inférieure à -30°C et de les y maintenir pendant le transport au laboratoire. Des boîtes isolantes contenant de la neige carbonique peuvent être utilisées à cette fin.

2.3 Préparation du matériel

Echantillons de selles et échantillons coprologiques prélevés par tubage anal. Déposer environ 1-2 g de selles et 10-20 ml de solution saline équilibrée de Hanks froide¹ dans un tube à centrifuger de 50 ml à paroi épaisse, contenant 20 à 30 perles de verre stériles. Fermer hermétiquement le tube à l'aide d'un bouchon en caoutchouc et agiter jusqu'à ce que toutes les grosses particules de selles soient désagrégées. La suspension est ensuite centrifugée pendant trente minutes à 3000-8000 g dans une centrifugeuse réfrigérée. Le surnageant est alors transvasé dans un flacon approprié puis additionné d'une solution d'antibiotiques en quantité telle que les concentrations finales par ml soient les suivantes : pénicilline, 600 µg; streptomycine, 1000 µg; néomycine, 500 µg; nystatine, 17 µg. Le matériel est ensuite conservé dans un congélateur à -30°C ou moins jusqu'à ce qu'il soit utilisé.

¹ Hanks, J. H. & Wallace, R. E. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 71: 196 (1949).

Echantillons obtenus par écouvillonnage rectal. On exprime le liquide qui imprègne le tampon dans le MTV en pressant fortement l'écouvillon contre la paroi du récipient, puis on jette le tampon. Le matériel est alors transvasé dans un tube à centrifuger contenant des perles de verre stériles et traité de la même manière que les échantillons de selles, conformément à la description ci-dessus.

Matériel nécropsique. Placer dans un mortier stérile un fragment pesé de tissu prélevé dans le système nerveux central (1-2 g). Le couper en menus morceaux à l'aide de ciseaux stériles puis ajouter une petite quantité de sable de quartz stérile avec environ 2 ml de solution saline équilibrée de Hanks froide. Broyer les fragments de tissu avec un pilon jusqu'à obtention d'une pâte homogène. Ajouter de nouveau du liquide pour obtenir une suspension de 100 g/l. La transvaser dans un tube à centrifuger et procéder conformément à la description donnée plus haut pour les échantillons de selles.

2.4 Isolement du virus

Les poliovirus se développent bien en cultures primaires ou secondaires de cellules rénales de diverses espèces de singes (rhésus, cynomolgus, vervet, patas, babouin). Pour les laboratoires qui ne disposeraient pas de cellules rénales de singe, il est recommandé d'utiliser la lignée cellulaire Hep-2 (Cincinnati).

Pour l'isolement du virus, on utilise des cultures en couches monocellulaires préparées dans des tubes à essai. La veille de l'inoculation du matériel traité, les cultures sont examinées au microscope pour vérifier que leur développement est normal et le milieu de croissance est remplacé par du milieu de survie, de manière à éliminer tous les inhibiteurs viraux qui pourraient être présents dans le sérum de bovins utilisé pour la croissance initiale. Immédiatement avant l'inoculation, le milieu de survie est retiré et les cultures sont égouttées. On inocule quatre cultures avec le même échantillon en introduisant 0,2 ml dans chaque tube à essai. Les tubes sont ensuite placés en position presque horizontale pendant trente minutes à la température ambiante afin de permettre l'adsorption du virus. On ajoute alors du milieu de survie (0,8 ml) puis les tubes sont incubés à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 14 jours, le milieu de survie étant renouvelé le septième jour. Des cultures non inoculées provenant de la même suspension cellulaire sont également incubées pour servir de témoins. Il est recommandé d'utiliser comme milieu de survie le milieu B de

Melnick (voir annexe 1) ou le milieu 199 dans les cas où sont utilisées des cultures de cellules rénales; pour les cultures de cellules Hep-2, il est en revanche préférable d'utiliser le milieu de base d'Eagle additionné de sérum de veau foetal ou de sérum de veau agammaglobulinémique (voir l'annexe 1).

Les cultures doivent être examinées au microscope au moins tous les deux jours, et celles qui présentent une dégénérescence non caractéristique pendant la durée de l'incubation sont repiquées dans quatre cultures cellulaires. Les cultures (y compris les repiquages) qui manifestent un effet cytopathogène sont récoltées et conservées au congélateur jusqu'aux expériences d'identification.

2.5 Identification des isolements de poliovirus

Les techniques d'isolement utilisées dans le cadre de la surveillance de la poliomyélite ont pour objet de différencier le poliovirus des autres virus isolés et de déterminer son type. C'est pourquoi les seuls sérums nécessaires dans ces études sont ceux qui servent au typage des poliovirus. Les sérums pour typage destinés aux examens de laboratoire peuvent être obtenus par le truchement de l'OMS.¹ Pour le typage des poliovirus, les mélanges de sérums sont plus indiqués qu'un sérum unique car ils permettent d'éviter de considérer comme non poliomyélitiques des isolements contenant plusieurs types de poliovirus. A cet effet, on devra disposer des mélanges d'immunsérums correspondant aux divers types de poliovirus : types 1+2 (premier mélange); types 1+3 (deuxième mélange); types 2+3 (troisième mélange); types 1+2+3 (quatrième mélange).

Ces mélanges doivent contenir chaque type de sérum à raison de 20 unités internationales d'anticorps neutralisants dans un volume égal à celui de la suspension virale à utiliser dans l'épreuve de neutralisation, soit 0,025 ml si l'on utilise les microtechniques et 0,1 ml si l'on utilise les macrotechniques (voir ci-après).

On identifie les virus isolés en observant l'effet cytopathogène et sa neutralisation dans le même système cellulaire

¹ S'adresser au Laboratoire international d'Etalons biologiques, Statens Serum Institute, 80 boulevard Amager, Copenhague (Danemark).

que celui qui a été utilisé pour les opérations d'isolement. On peut avoir recours aussi bien à une microtechnique qu'à une macrotechnique, la première étant particulièrement intéressante lorsque l'on doit identifier en même temps un grand nombre de souches.

Microtechnique. Matériel nécessaire : 1) plaques de microtitrage stériles jetables, adaptées à la culture cellulaire et creusées chacune de 96 godets à fond plat d'une capacité de 0,3 à 0,4 ml; 2) pellicule auto-adhésive pour sceller les plaques; 3) feuilles d'aluminium stériles de 14 x 10 cm (à moins que les plaques ne soient munies d'un couvercle); 4) pipette automatique réglable à embouts stériles jetables en matière plastique, capable de distribuer des volumes de 0,025 à 0,1 ml.

Pour déterminer le titre des isolements de virus, on les dilue de 10 en 10 dans un diluant (voir l'annexe 5), de 1:10 à 1:1 000 000. On dépose 0,025 ml de chaque dilution de virus dans une rangée de 4 cupules contenant 0,025 ml de diluant pour virus et 0,1 ml d'une suspension de cellules Hep-2. Ces cellules sont préparées à une concentration de 5000-10 000 cellules par ml dans un milieu de dilution pour virus. Les cupules sont recouvertes de 0,075 ml de paraffine liquide et les plaques de microtitrage scellées au moyen d'une pellicule auto-adhésive. Mises à l'étuve à 35°C pendant 7 jours, les plaques sont examinées le troisième ou le quatrième jour, puis le septième à l'aide d'un microscope inversé. Toute cupule où l'on observe une dégénérescence, indice d'une prolifération virale, est enregistrée parmi les résultats positifs et le titre des virus s'obtient par la méthode de Reed et Muench. On calcule la dilution à laquelle l'isolement contient 100 DCP₅₀ pour 0,025 ml et on l'utilise dans la méthode de typage du virus ci-après.

Pour chacun des isolements, on se sert d'une rangée (12 cupules) de la plaque de microtitrage : la rangée A pour le premier isolement, la rangée B pour le deuxième, etc. Les isolements de virus dilués sont répartis dans les cupules au moyen d'une pipette automatique distribuant des volumes de 0,025 ml. Pour répartir les divers isolements, on utilise des embouts de pipette jetables. Le numéro attribué par le laboratoire à l'isolement de virus est inscrit sur le bord gauche de la plaque, au niveau de la rangée appropriée.

Une fois les isolements distribués, on ajoute dans les cupules 0,025 ml des mélanges de sérums de typage au moyen d'une

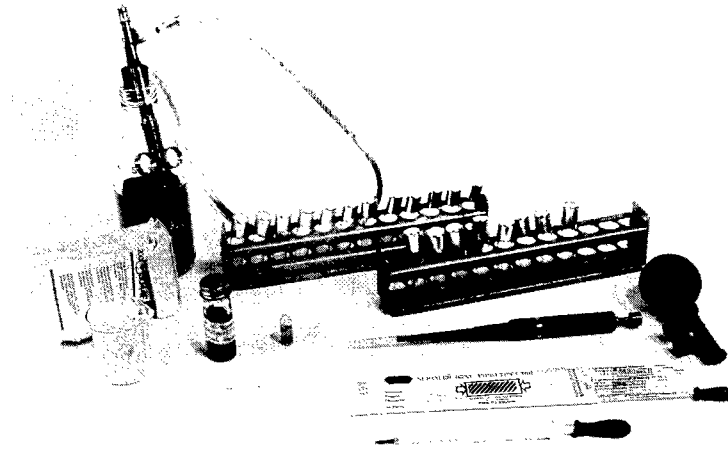


Fig. 1 Ensemble du matériel nécessaire pour microtechniques sérologiques



Fig. 2 Introduction, à l'aide d'une seringue automatique, d'un volume fixe de solvant dans des tubes à essai bouchés et stériles



Fig. 3 Préparation de dilutions de sérum de deux en deux à l'aide d'une pipette automatique munie d'embouts stériles jetables

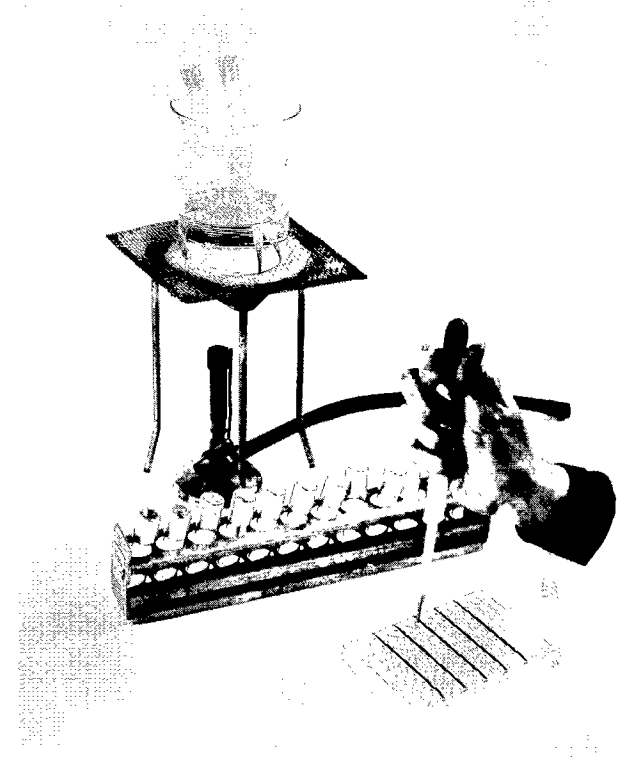


Fig. 4 Introduction de sérum ou de virus dans les cupules appropriées d'une plaque de microtitrage à l'aide d'une pipette distribuant des gouttes de 0,025 ml.

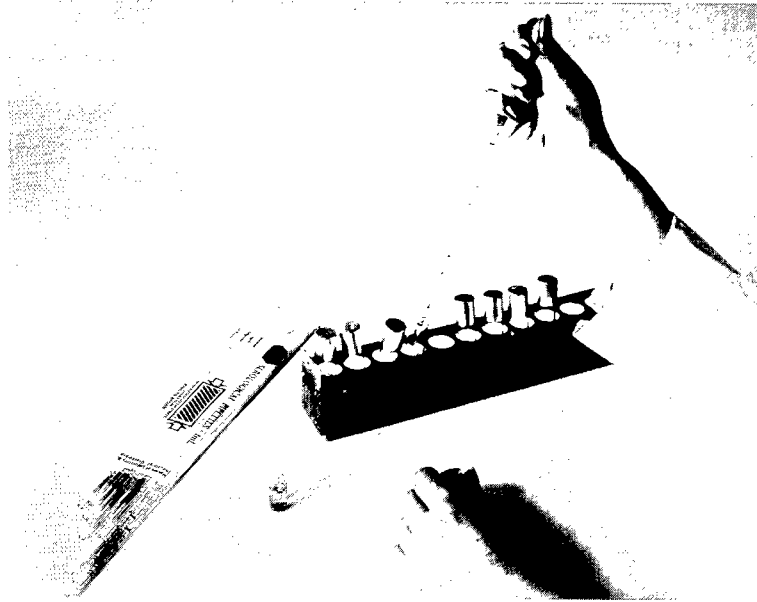


Fig. 5 Dilution progressive du virus (utiliser une nouvelle pipette pour chaque dilution)

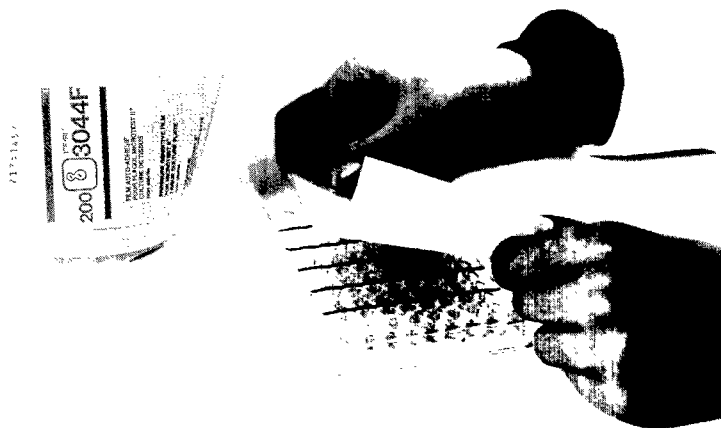


Fig. 6 Collage sur la plaque d'une pellicule adhésive après remplissage des cupules

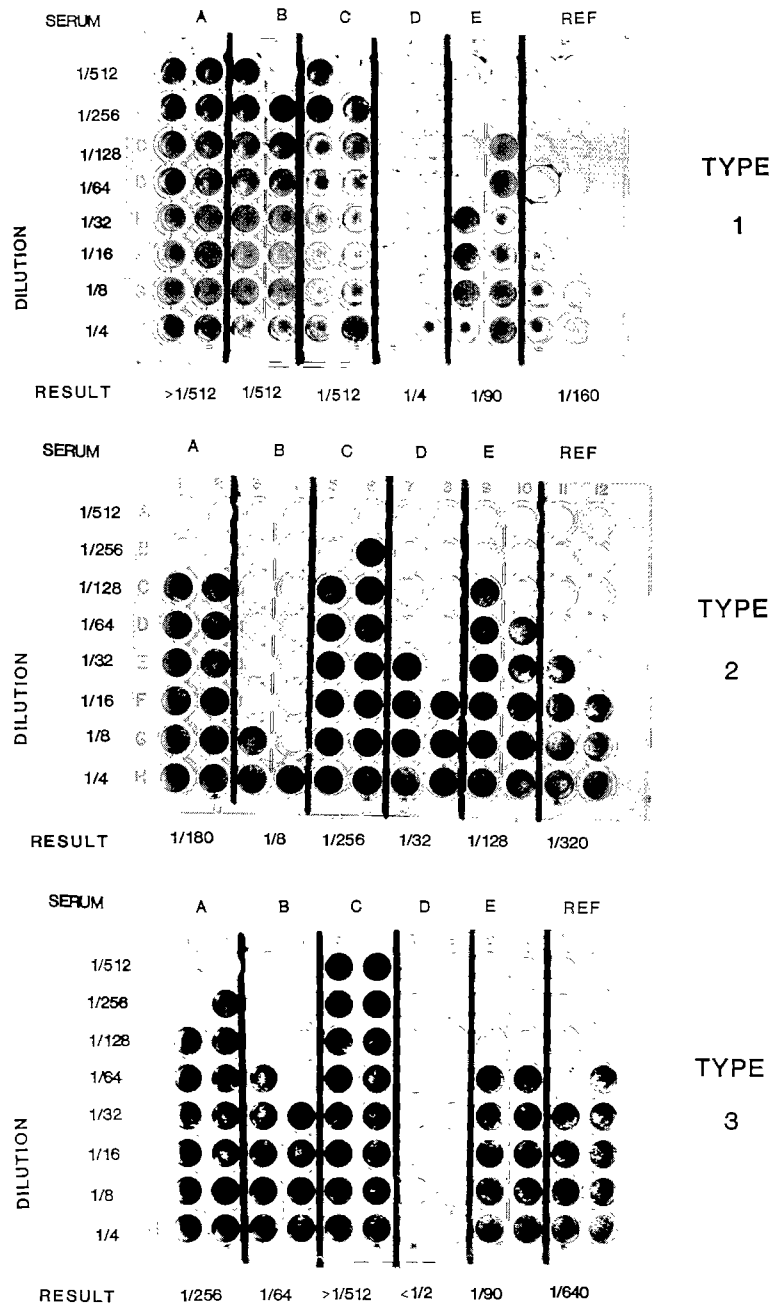


Fig. 7 Résultats du titrage des anticorps neutralisants antipoliiovirus dans cinq sérums humains

pipette automatique selon le schéma ci-après : dans chaque rangée, ajouter le premier mélange dans les cupules 1 et 2, le deuxième dans les cupules 3 et 4, le troisième dans les cupules 5 et 6 et le quatrième dans les cupules 7 et 8. Les cupules 9-12 servent de témoins et ne contiennent que 0,025 ml d'un milieu de survie. On renouvelle l'embout de la pipette chaque fois que l'on prélève un mélange ou le milieu de survie. Les mélanges de sérums de typage sont désignés par une étiquette apposée sur le bord supérieur de la plaque.

On recouvre la plaque d'une feuille d'aluminium stérile et on l'incube en atmosphère humide à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 60 minutes. Puis on prépare une suspension de cellules appropriées (section 2.4) contenant $5-10 \times 10^4$ cellules par ml dans un milieu composé d'un milieu de base de Eagle renfermant 1,3 g/l de bicarbonate de sodium et 40 g/l de sérum de veau foetal ou de sérum de veau agammaglobulinémique et l'on verse 0,1 ml de cette suspension dans chaque cupule. On recouvre alors les cupules de 0,075 ml de paraffine liquide et l'on scelle la plaque au moyen d'une pellicule auto-adhésive.

La plaque est mise à l'étuve à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 7 jours et l'on procède à des lectures quotidiennes au moyen d'un microscope inversé. Les résultats sont évalués de la manière indiquée plus bas (section 2.6).

Macrotechnique. Les épreuves de neutralisation sont effectuées dans des cultures monocouches de cellules appropriées (section 2.4) préparées dans des tubes à essai.

Le titre du virus isolé est déterminé comme par la microtechnique, à ceci près que les dilutions virales sont préparées dans le milieu de survie approprié (voir la section 2.4 et l'annexe 1), et que l'on prend quatre cultures contenant 0,9 ml de milieu de survie pour y introduire 0,1 ml de dilution virale. Après lecture des cultures, on calcule à quelle dilution l'isolement contient 100 DCP_{50} pour 0,1 ml. On répartit alors cette dilution virale dans 5 tubes à essai à raison de 0,3 ml chacun. Puis on verse un volume identique (0,3 ml) des 4 mélanges de sérums antipoliomyélitiques dans les tubes à essai conformément au schéma ci-après : tube N° 1, premier mélange; tube N° 2, deuxième mélange; tube N° 3, troisième mélange; tube N° 4, quatrième mélange. Le cinquième tube à essai sert de témoin et l'on y ajoute seulement 0,3 ml de milieu de survie. Les tubes sont alors bouchés et mis à l'étuve à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 60 minutes,

puis on ajoute chaque mélange virus-immunsérum dans deux cultures cellulaires à raison de 0,2 ml chacune et l'on inocule à deux autres cultures 0,2 ml (chacune) de la suspension virale témoin. On introduit 0,8 ml de milieu de survie dans chaque tube et l'on met les cultures à l'étuve à 35°C ± 0,5°C pendant 7 jours. Les résultats deviennent apparents dès le troisième ou le quatrième jour, mais les lectures définitives ne sont faites que le septième.

2.6 Evaluation des résultats

Les cultures cellulaires de contrôle doivent donner un résultat positif. On évalue alors les résultats comme suit :

- 1) Si les tubes où ont été inoculés le premier, le second et le quatrième mélange sérum-virus montrent un résultat négatif, on a affaire au poliovirus type 1.
- 2) Si les tubes où ont été inoculés le premier, le troisième et le quatrième mélange sérum-virus montrent un résultat négatif, il s'agit du poliovirus type 2.
- 3) Si les tubes où ont été inoculés le deuxième, le troisième et le quatrième mélange sérum-virus montrent un résultat négatif, le virus isolé est le poliovirus type 3.
- 4) Si les tubes où ont été inoculés le premier et le quatrième mélange sérum-virus montrent un résultat négatif, l'isolement contient les poliovirus types 1 et 2.
- 5) Si les tubes où ont été inoculés le deuxième et le quatrième mélange sérum-virus montrent un résultat négatif, l'isolement contient les poliovirus types 1 et 3.
- 6) Si les tubes où ont été inoculés le troisième et le quatrième mélange sérum-virus montrent un résultat négatif, l'isolement contient les poliovirus types 2 et 3.
- 7) Si le tube où a été inoculé le quatrième mélange sérum-virus montre un résultat négatif, l'isolement contient les poliovirus types 1, 2 et 3.
- 8) Si aucun des tubes où ont été inoculés des mélanges sérum-virus ne montre de résultat négatif, l'isolement contient soit le poliovirus et un autre entérovirus, soit un entérovirus non poliomyélitique, soit enfin un virus d'un autre groupe (réovirus, herpèsvirus, adénovirus, etc.). Dans ce cas, on enregistre l'isolement comme non identifié.

3. TITRAGE DES ANTICORPS NEUTRALISANTS

3.1 Echantillons de sérum

La quantité minimale de sérum nécessaire à un titrage est 0,1 ml. La piqûre d'un doigt fournit de 0,2 à 0,3 ml de sang que l'on peut recueillir dans un petit tube de verre ou de plastique stérile et bouché. Dès que possible après coagulation, on recueille le sérum et on le transvase dans des fioles en matière plastique pour le conserver à une température égale ou inférieure à -20°C. Il est recommandé d'inactiver les échantillons de sérum avant le stockage en les chauffant à 56°C pendant 30 minutes car on peut ainsi limiter les problèmes dus à la contamination bactérienne des spécimens.

3.2 Réactifs et cultures cellulaires

Sérums internationaux de référence de l'OMS. Ces sérums permettent de vérifier en permanence la sensibilité des titrages et d'exprimer les titres d'anticorps en unités internationales. Des ampoules de ces préparations peuvent être obtenues auprès de l'OMS.¹

Sérums de travail servant de référence dans les laboratoires. Ces sérums doivent être préparés au laboratoire même; leur activité, exprimée en unités internationales, sera déterminée par comparaison avec les sérums internationaux de référence.

Préparations virales stocks de pureté établie et de titre connu, exécutées en laboratoire. L'OMS est en mesure de fournir des échantillons appropriés des divers types de poliovirus à partir desquels on peut préparer des réserves de virus destinées à la réalisation des épreuves (voir l'annexe 2).

Cultures cellulaires. On peut utiliser toute culture cellulaire suffisamment sensible aux poliovirus (voir la section 2.4). Si l'on se sert de la lignée cellulaire Hep-2 (Cincinnati), il faut établir une banque de cellules pour disposer en permanence d'une source d'approvisionnement et éviter ainsi de soumettre les cellules à de trop nombreux passages pouvant entraîner une

¹ S'adresser à : Research Resources Branch, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique.

perte de sensibilité au virus. L'annexe 3 décrit la préparation des cellules aux fins des titrages sériques et l'annexe 4 indique comment constituer une banque de cellules qui sera conservée dans l'azote liquide.

Milieux de culture cellulaire. Les milieux de culture cellulaire peuvent agir sur la sensibilité des cultures aux poliovirus mais sans que leur influence soit généralement déterminante. Le milieu de base de Eagle est recommandé; on peut se le procurer dans le commerce sous forme de poudre. Il convient de le préparer conformément aux instructions du fabricant.

3.3 Matériel spécial

Des flacons de verre ou de plastique offrant une surface plane de 25 à 35 cm² (jusqu'à 250 cm²) pour le développement des cellules sont utiles pour les cultures et la préparation des mélanges de virus. On présume que les titrages d'anticorps se feront dans les cupules à fond plat de plaques en plastique jetables. La plaque de microtitrage idéale comporte 96 cupules (12 rangées de 8) ayant chacune une capacité approximative de 0,3 ml. Les plaques sont scellées au moyen d'une pellicule adhésive piézosensible.

Un travail rapide et précis avec une plaque de microtitrage exige l'utilisation de pipettes ou de compte-gouttes distribuant des volumes de 0,025 ml. Si l'on entreprend une vaste enquête sérologique, on a intérêt à utiliser des pipettes automatiques conçues pour accélérer les manipulations.

3.4 Mode opératoire

Pour chaque sérum à éprouver, préparer une série de 8 tubes à essai contenant 0,3 ml de diluant pour le premier (voir l'annexe 5) et 0,2 ml de diluant pour les autres (voir la figure 2). A l'aide d'une pipette automatique, mettre 0,1 ml de sérum pur dans le premier tube et bien remuer. Puis, avec une autre pipette, transvaser 0,2 ml du sérum dilué dans le deuxième tube et mélanger soigneusement. Transférer ensuite 0,2 ml du deuxième tube dans le troisième (figure 3). Répéter l'opération jusqu'à ce que les 8 tubes aient été utilisés. On aura ainsi un sérum dilué de 2 en 2 de 1:4 à 1:512. Prendre trois plaques de microtitrage et les étiqueter "type 1", "type 2" et "type 3". A l'aide d'une pipette compte-gouttes de 0,025 ml (figure 4), introduire une goutte du sérum le plus dilué (1:512) dans les cupules 1 et 2 de la rangée A de chacune des trois plaques, rejeter le liquide restant dans la

pipette et la remplir avec la dilution suivante (1:256). Mettre une goutte dans chacune des cupules 1 et 2 de la rangée B des trois plaques et continuer jusqu'à ce que la dilution 1:4 ait été placée de la même manière dans la rangée H. On peut répéter l'opération jusqu'à ce que les trois plaques contiennent les dilutions de six sérums. On peut procéder ainsi avec autant de groupes de trois plaques qu'il est possible d'en manipuler commodément en prenant soin de laisser dans un groupe au moins deux rangées de 8 cupules pour les sérums de référence. Chaque épreuve doit comporter le titrage de sérums de référence types 1, 2 et 3 qui seront dilués de façon appropriée et placés chacun sur une plaque portant son numéro de type.

Préparer des suspensions de virus d'épreuve types 1, 2 et 3 calculées pour renfermer un nombre estimatif de 100 DCP₅₀ dans 0,025 ml. Les dilutions se font à peu près comme pour le sérum, mais de 10 en 10 (figure 5). Ajouter des volumes de 0,025 ml de virus d'épreuve du type 1 à toutes les plaques marquées type 1 et procéder de même pour les types 2 et 3. Couvrir les plaques et les incubés à 35°C ± 0,5°C pendant trois heures.

Pour déterminer le titre du virus d'épreuve, préparer à partir de ce virus une série de trois dilutions de 10 en 10 (0,5 ml de virus plus 4,5 ml de solvant) et introduire 0,025 ml de ces dilutions ainsi que 0,025 ml de la suspension stock de virus d'épreuve dans chacune des 4 cupules contenant 0,025 ml de solvant au lieu de sérum. Incuber la plaque avec celles qui contiennent les mélanges sérum-virus.

A l'issue de la période d'incubation, introduire dans chacune des cupules, sur l'ensemble des plaques, 0,1 ml de suspension cellulaire préparée de la manière décrite à l'annexe 3, sections 2-4, mais dans le diluant (annexe 5) au lieu du milieu de croissance. Les cellules peuvent être ajoutées d'une manière quelconque assurant la distribution constante d'un volume de 0,1 ml. Chaque cupule renferme alors environ 5×10^3 cellules. Sceller les plaques avec une pellicule auto-adhésive (figure 6) et mettre à l'étude à 35°C ± 0,5°C pendant sept jours.

3.5 Evaluation des résultats

Observer l'effet cytopathogène le troisième ou le quatrième jour puis, de nouveau, le septième jour. Seront enregistrées comme présentant un résultat positif toutes les cupules où la nappe de cellules sera entièrement détruite ou presque. Pour examiner les couches monocellulaires dans les plaques au cours

de la période d'incubation, il est préférable d'utiliser un microscope inversé. L'épreuve est valable si l'estimation du titre du virus d'épreuve se situe entre 30 et 200 DCP₅₀ par cupule. Le titre sérique s'exprime par la plus forte dilution à laquelle on n'observe aucun effet cytopathogène du virus dans une cupule au moins et se calcule en unités internationales, c'est-à-dire par rapport à l'activité des sérums internationaux de référence.

Les résultats obtenus dans le titrage de cinq sérums humains et des sérums de référence sont indiqués à la figure 7. Pour permettre de distinguer plus nettement des autres les cupules ayant subi un effet cytopathogène, on a coloré les cellules survivantes.

Annexe 1

COMPOSITION DES MILIEUX

Milieu de transport pour virus

solution saline équilibrée de Hanks (stérile)	86,0 ml
solution d'albumine bovine, 100 g/l	10,0 ml
NaHCO ₃ (56 g/l)	1,5-2,0 ml*
solution de pénicilline (6 mg/ml) et de streptomycine (10 mg/ml) en solution saline tamponnée au phosphate A'	1,0 ml
nystatine (0,83 mg/ml en solution saline tamponnée au phosphate A)	1,0 ml
rouge de phénol (4 g/l dans de l'eau distillée)	0,5 ml

* Quantité nécessaire pour amener le pH à la neutralité.

Milieu B de Melnick

solution saline équilibrée de Earle contenant 0,02 g/l de rouge de phénol	86,0 ml
hydrolysate de lactalbumine (50 g/l en solution saline équilibrée de Hanks sans bicarbonate ni rouge de phénol)	10,0 ml
NaHCO ₃ (75 g/l)	3,0 ml
solution antibiotique (pénicilline 6 mg/ml, streptomycine 10 mg/ml, nystatine 0,83 mg/ml)	1,0 ml

Milieu de survie pour la lignée cellulaire Hep-2 (Cincinnati)

milieu de base de Eagle en solution saline équilibrée de Earle	95,5 ml
NaHCO ₃ (75 g/l)	1,5 ml
sérum de veau fœtal ou sérum de veau agammaglobulinémique	2,0 ml
solution antibiotique (pénicilline 6 mg/l, streptomycine 10 mg/ml, néomycine 3,2 mg/ml)	1,0 ml

* * *

Annexe 2

PREPARATION DES SUSPENSIONS VIRALES STOCKS

Les souches de virus de semence fournies par l'OMS doivent être conservées à une température égale ou inférieure à -30°C. Au moment de les utiliser, les diluer au 1:10 dans du diluant pour virus.

Choisir quelques cultures de cellules Hep-2 présentant des nappes confluentes et les débarrasser du milieu de croissance en les rinçant avec un milieu qui sera chargé deux fois (diluant pour virus ou solution saline équilibrée de Hanks) à raison d'1 ml environ pour 5 cm² de nappe cellulaire. Egoutter les cultures et y introduire un volume équivalent de diluant pour virus calculé de manière qu'au moment où l'on ajoute la semence de virus elle soit diluée à un centième de plus dans le volume final (la semence initiale sera ainsi diluée au millième).

* * *

Annexe 3

CULTURE DE CELLULES Hep-2 (CINCINNATI) EN FLACONS

Réactifs

Trypsine

concentration finale de 2,5 g/l dans une solution saline équilibrée (de Hanks, de Earle, ou tamponnée au phosphate, à pH de l'ordre de 7,8)

Milieu

milieu de base de Eagle dans une solution saline équilibrée de Earle	95 ml
sérum de veau fœtal	5 ml
pénicilline	6 mg
streptomycine	10 mg

Pour tamponner, ajouter du bicarbonate de sodium de manière à obtenir une concentration finale de 0,88 g/l. Chauffer le milieu et la solution de trypsine à 37°C avant l'utilisation.

Repiquage des cellules

- 1) Choisir une culture qui présente une nappe cellulaire confluente, jeter le milieu et rincer deux fois avec 5 ml d'une solution de trypsine. Jeter la trypsine et laisser le flacon à la température de la pièce (ou l'incuber à 37°C) jusqu'à ce que les cellules commencent à se détacher du verre.
- 2) Ajouter environ 5 ml de milieu tiède (37°C). Agiter la bouteille de manière que le milieu passe plusieurs fois sur la nappe et décolle entièrement les cellules du récipient. Aspirer et refouler alternativement en utilisant une pipette de 5 ml munie d'une poire, afin de désagréger les cellules au maximum.
- 3) Ajouter encore 55 ml de milieu (ce qui donne un total de 60 ml) et répartir le quart du volume total de la suspension cellulaire (soit 15 ml) dans trois autres boîtes ayant la même surface que la première. On aura ainsi divisé la suspension initiale en quatre parties.
- 4) Incuber les cultures à 37°C.
- 5) Diviser de nouveau les cultures en quatre parties tous les trois à quatre jours, lorsque les cellules ont formé des nappes confluentes.
- 6) Enregistrer soigneusement le nombre de repiquages.

* * *

Annexe 4

CONSERVATION D'UNE BANQUE DE CELLULES Hep-2 DANS L'AZOTE LIQUIDE

Réactifs

Trypsine

Trypsine en solution saline équilibrée de Hanks (2,5 g/l)

Milieu 1

milieu de base de Eagle en solution saline équilibrée de Earle (bicarbonate de sodium : 0,55 g/l)	85 ml
sérum de veau fœtal	15 ml

Milieu 2

milieu de base de Eagle en solution saline équilibrée de Earle (bicarbonate de sodium : 0,55 g/l)	65 ml
sérum de veau fœtal	15 ml
diméthylsulfoxyde ou glycérol	20 ml

Congélation des cellules

- 1) Utiliser les boîtes contenant des nappes de cellules confluentes.
- 2) Extraire les nappes de cellules en trypsinant de la manière habituelle (voir l'annexe 3).
- 3) Désagréger les cellules dans 0,5 ml du milieu 1 en aspirant et refoulant alternativement à l'aide d'une pipette pour obtenir une concentration d'environ 6×10^6 cellules par ml.
- 4) Ajouter 0,5 ml du milieu 2 à la suspension de cellules environ 30 minutes avant de sceller les cellules dans des ampoules. La concentration finale en diméthylsulfoxyde ou en glycérol sera ainsi de 100 μ l/ml et celle des cellules d'environ 3×10^6 par ml, ce qui correspond approximativement à ce que peut fournir une couche monocellulaire confluyente dans un récipient de 150 ml ayant une surface de 50 cm².
- 5) Dans une ampoule de 1,5 ml, introduire environ 1 ml de suspension cellulaire et sceller.

6) Congeler les cellules en réduisant la température de moins de 5°C par minute jusqu'à environ -50°C. On peut régler la vitesse de refroidissement en plaçant les ampoules dans un récipient que l'on réfrigère progressivement dans la phase gazeuse qui se forme au-dessus de l'azote liquide. La température des ampoules est contrôlée à l'aide d'un thermomètre à alcool et on règle la rapidité de l'abaissement de la température afin d'obtenir la vitesse de refroidissement recherchée.

7) Immerger et stocker les ampoules dans l'azote liquide.

Reconstitution des cellules

1) Retirer les ampoules que l'on veut faire dégeler, et réchauffer rapidement les cellules en les plongeant dans de l'eau à environ 40°C.

2) Essuyer l'extérieur de l'ampoule avec de l'alcool à 700 ml/l.

3) A l'aide d'une pipette à fine extrémité capillaire, retirer le contenu de l'ampoule et ensemençer chaque ml de suspension de cellules dans un récipient de 150 ml préchauffé.

4) Aspirer et refouler alternativement les cellules à l'aide d'une pipette à fine extrémité capillaire.

5) Ajouter lentement 15 ml environ de milieu antibiotique préchauffé (composé de la manière indiquée à l'annexe 3 mais avec 10 ml de sérum).

6) Incuber de 2 à 4 heures à 37°C, puis retirer le milieu et le remplacer par 15 ml de milieu frais.

7) Les cellules devraient atteindre le stade de la confluence en 4 à 7 jours.

* * *

Annexe 5

DILUANT POUR SERUM ET VIRUS

Le diluant pour sérum et virus se compose du milieu de base de Eagle contenant 1,3 g/l de bicarbonate de sodium et de 40 ml/l de sérum de veau fœtal plus 120 µg de pénicilline et 100 µg de streptomycine.
