

Maladie de Newcastle : un enzyme-linked immunosorbent assay pour le contrôle des anticorps chez les poussins

Autor(en): **Oppliger, Anne**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **133 (1991)**

Heft 8

PDF erstellt am: **27.04.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-591835>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

MALADIE DE NEWCASTLE: UN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY POUR LE CONTRÔLE DES ANTICORPS CHEZ LES POUSSINS

ANNE OPPLIGER

RÉSUMÉ

Un enzyme-linked immunosorbent assay, utilisant comme antigène une souche vaccinale du virus de la maladie de Newcastle a été développé. Cette alternative à l'inhibition de l'hémagglutination permet de surveiller la chute du taux d'anticorps maternels chez les poussins entre 1 et 28 jours.

Une étude comparative a montré une bonne corrélation entre l'enzyme-linked immunosorbent assay et l'inhibition de l'hémagglutination.

MOTS CLÉS: Maladie de Newcastle – enzyme-linked immunosorbent assay – poussin

NEWCASTLE DISEASE: AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TO CONTROL ANTIBODIES IN CHICKS

An enzyme-linked immunosorbent assay using a vaccine strain of Newcastle disease as antigen has been developed. It allows the control of the drop in the maternal antibody level of 1 and 28 days old chicks. Thus it can be used as alternative to the inhibition of hemagglutination method. A comparative study has shown a good correlation between the enzyme-linked-immunosorbent-assay and the inhibition of hemagglutination.

KEY WORDS: Newcastle disease – enzyme-linked immunosorbent assay – chick

INTRODUCTION

Depuis sa description originale par Engvall et Perlmann (1971), l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) a été adapté et utilisé pour détecter les anticorps (Ac) de nombreuses maladies infectieuses. L'utilisation de ce test pour détecter les Ac de la maladie de Newcastle (NCD) en utilisant comme antigène (Ag) un virus purifié a déjà été rapportée (Snyder et al., 1983; Wilson et al., 1984). La purification de l'antigène demandait alors un matériel technique important et de nombreuses manipulations.

Notre but ici, était de réaliser une méthode simple, à la portée de tous les laboratoires et ne nécessitant aucun matériel spécial, permettant ainsi un contrôle aisé de la chute du taux d'anticorps maternels de la NCD chez les poussins importés en Suisse.

Rappelons que notre pays est exempt de NCD et que la vaccination des volailles est interdite. Dès lors le contrôle systématique et rigoureux de toutes les volailles vivantes importées est obligatoire. Les poussins d'un jour issus de mère vaccinée possèdent une immunité maternelle qui chute assez rapidement. Le contrôle de la perte de cette immunité maternelle entre l'âge de 1 et 28 jours est obligatoire pour obtenir le permis d'importation des lots de poussins.

MATÉRIEL ET METHODE

Antigène: Une souche vaccinale lyophilisée (SOTASEC 1000, souche LA SOTA, Rhône Mérieux, Lyon) a été utilisée telle quelle, après dilution dans du tampon carbonate-bicarbonate à pH 9,6 (4,24 g Na₂CO₃, 5,04 g NaHCO₃, 1 l d'eau dist.).

Conjugué: La peroxidase de raifort conjuguée à des immunoglobulines G (Fc et Fab) anti-poulet provenant de lapin (RACH/IgG(H+L)/PO, Nordic immunological laboratories) a été utilisée.

Substrat: Le substrat utilisé est l'ABTS [2,2' Azino-di-(3-ethyl-benzothiazolin-sulfonate-6), Boehringer Mannheim AG]. La préparation de ce dernier se fait comme suite: Solution A: 13,61 g acétate de Na dans 1 litre d'eau dist. Solution B: 5,9 ml acide acétique dans 1 litre d'eau dist. Prendre 240 ml de A et 760 ml de B, mélanger en y ajoutant 6,9 g NaH₂PO₄. H₂O. Ajuster le pH à 4,2 avec de l'acide acétique 1M et pour finir ajouter 1,097 g d'ABTS. Avant l'utilisation ajouter 0,1% d'une solution de H₂O₂ à 30% dilué à raison de 1 ml dans 35 ml d'eau dist.

Liquide de lavage: Il s'agit d'une solution de tampon phosphate-Tween (PBS-Tween) pH 7,4. (PBS: 16,7 g Na₂HPO₄, 5,7 g NaH₂PO₄, 85 g NaCl, 10 litres d'eau

dist.). Conserver à 4 °C et ajouter 1% de Tween 20 avant l'emploi.

Sérums: 2 séries de 46 poussins ont été testées (deux prélèvements de sang à 28 jours d'intervalle au sein du même lot d'importation). Les témoins négatifs sont des sérums de poussins d'un jour issus de mère non vaccinée contre la NCD, les témoins positifs sont des sérums de poussins de 1 jour provenant de mères vaccinées contre la NCD et ayant un titre IH de 1:512.

ELISA: La technique utilisée a été faite selon Voller et al. (1980). Les concentrations optimales de l'antigène (1:40), du conjugué (1:5000) et du sérum (1:160) ont été déterminées par titration. Les concentrations choisies étant celles qui donnaient le rapport du signal spécifique au bruit de fond le plus élevé.

100 µl de la solution d'antigène sont mis dans tous les puits d'une plaque microtiter de 96 trous en polystyrène (Linbro. Flow Laboratories). Après une incubation de 12 heures à 4 °C, la plaque est lavée 3 fois avec la solution de lavage (5 minutes à chaque fois). Puis les sites sont saturés en incubant la plaque durant 30 minutes à 37 °C avec une solution de gélatine à 0,5%.

Les sérums à tester sont dilués 1:160 dans le PBS-Tween, et 100 µl/puits sont placés dans trois puits différents; 3 lignes servant aux sérums des poussins de 1-3 jours et les 3 lignes suivantes recevant les sérums des mêmes lots de poussins mais récoltés alors que ces derniers avaient environ 28 jours.

Le lot de puits vides à disposition recevra les sérums témoins positifs et négatifs. Après une incubation d'une heure à 37 °C les sérums sont vidés des cupules et les plaques lavées 3 fois avec le PBS-Tween.

100 µl de conjugué dilué à 1:5000 dans le PBS-Tween sont distribués dans chaque puits et après une incubation d'une heure à 37 °C les plaques sont à nouveau lavées 3 fois.

100 µl de la solution substrat sont alors mis dans toutes les cupules, après 1 heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 492 nm avec un spectrophotomètre automatique pour plaques microtiter (Titerteck Multiskan. Flow Laboratories).

Tous ces tests ont été menés parallèlement à la méthode de l'IH classique. Dans le but de comparer ces deux techniques, des essais annexes ont été menés en effectuant des séries de dilutions des sérums (1:20 – 1:2560) afin de déterminer le titre ELISA (dilution limite donnant une réponse positive).

Interprétation des résultats: 1) Les moyennes des absorbances (AM) des trois tests de chaque sérum ont été recherchées et un facteur x a été calculé en divisant l'AM des sérums des poussins de 1 jour par l'AM des sérums des poussins de 28

jours du même lot d'importation. Ainsi la chute du taux d'anticorps peut être interprétée semi-quantitativement de la manière suivante: : +++ si $x \geq 3$; ++ si $2 \leq x < 3$; + si $1,5 \leq x < 2$; – si $x < 1,5$.

2) L'étude annexe comparative consistait à montrer la corrélation existant entre le titre IH et le titre ELISA. Ce dernier est obtenu suivant la méthode décrite par Snyder et al. (1983).

RÉSULTATS

Diminution du taux d'anticorps: Des différences significatives (t-Student: $P < 0,01$, $N = 46$) d'absorbance sont observées entre les ELISA des sérums des deux séries de poussins (1 et 28 jours). Pour la lecture des résultats, nous obtenons dans notre cas, pour les 2 séries de 46 sérums testés, les pourcentages suivant: 50% de +++, 42% de ++ et 8% de + (Tableau 1). Nos données révèlent que les sérums des poussins de 28 jours montrent une absorbance équivalente à nos sérums

Tableau 1: A = absorbance moyenne des sérums des poussins de 1 jour. B = absorbance moyenne des sérums des poussins de 28 jours. X = A:B, R = résultat. T+ = absorbance moyenne des sérums témoins positifs. T- = absorbance moyenne des sérums témoins négatifs

A	B	A:B	R	T+	T-
166	63	2.63	++	134	62
228	67	3.40	+++	185	53
174	45	3.87	+++	192	71
191	108	1.77	+	196	61
192	57	3.37	+++	165	54
163	34	4.79	+++	174	69
158	28	5.64	+++	167	35
104	28	3.71	+++	169	74
210	78	2.69	++	193	32
214	58	3.69	+++	203	46
173	62	2.79	++	220	58
178	80	2.23	++	199	62
208	83	2.51	++	185	52
197	62	3.18	+++	164	35
203	43	4.72	+++	212	40
207	91	2.27	++	172	80
207	65	3.18	+++	216	55
214	59	3.63	+++	166	43
247	129	1.91	+	232	32
218	62	3.52	+++	193	55
204	70	2.91	++	195	63
196	74	2.65	++	185	72

MALADIE DE NEWCASTLE: CONTRÔLE DES ANTICORPS CHEZ LES POUSSINS

A	B	A:B	R	T+	T-
227	69	3.29	+++	192	58
225	97	2.32	++	232	40
173	47	3.68	+++	221	46
148	36	4.11	+++	225	59
181	48	3.77	+++	205	72
175	50	3.50	+++	198	62
158	41	3.85	+++	172	49
151	48	3.15	+++	196	51
150	53	2.83	++		
142	78	1.82	+		
112	42	2.67	++		
125	76	1.64	+		
179	87	2.06	++		
173	66	2.62	++		
181	71	2.55	++		
224	87	2.57	++		
150	60	2.50	++		
225	69	3.26	+++		
193	66	2.92	++		
165	35	4.71	+++		
174	52	3.35	+++		
209	73	2.86	++		
214	57	3.75	+++		
189	75	2.52	++		

témoins négatifs (Mann-Whitney U test: $P > 0.2$, $N = 30$) et que par conséquent leur taux d'Ac contre la NCD n'est plus décelable. Ainsi une baisse plus ou moins importante du taux d'anticorps a toujours été observée entre les poussins de 1 et 28 jours provenant des même lots d'importation.

Corrélation: Une relation linéaire existe entre le titre ELISA et le titre IH. La droite de régression montre un coefficient de corrélation de 0.855 (Tableau 2) et un test non paramétrique de Spearmann nous montre que cette association est significative ($P < 0,01$, $N = 23$).

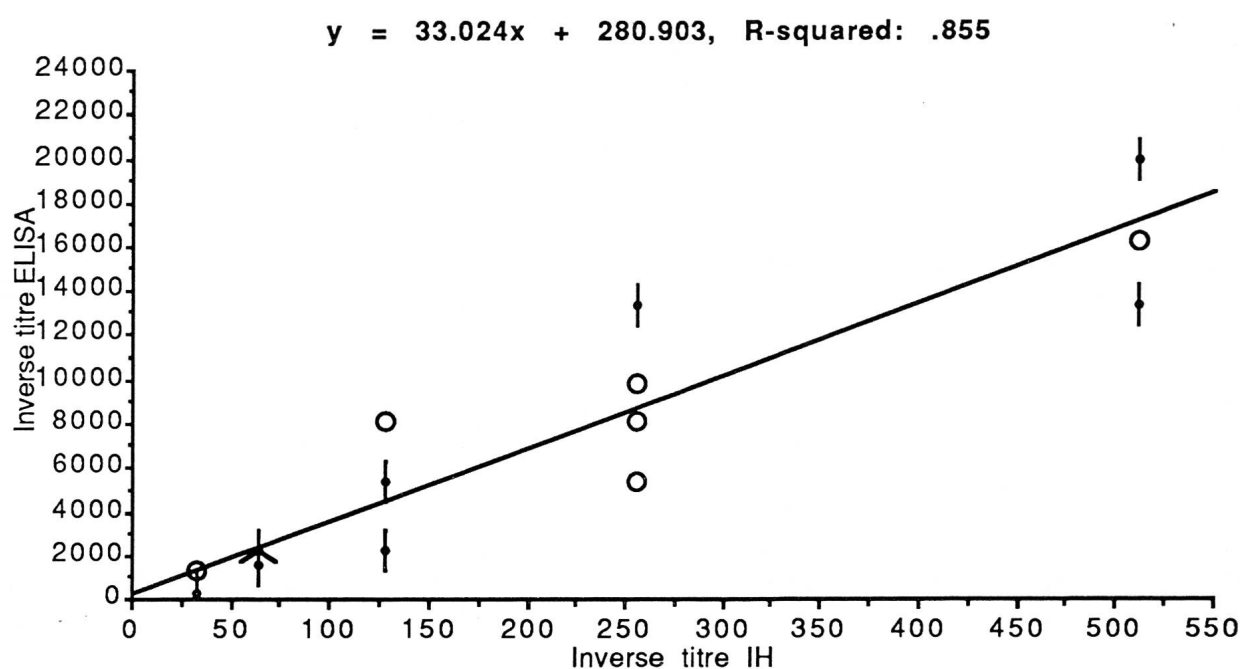
L'ELISA se montre alors plus sensible que l'IH. (Chez les poussins d'un jour le titre ELISA est en moyenne 35 fois plus grand que le titre IH).

DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de remplacer l'IH par une méthode ELISA plus simple par plusieurs points:

- Il n'est plus nécessaire d'entretenir du virus NCD par passage régulier sur oeufs embryonnés. Du fait de la standardisation des emballages de vaccins à 1000 DIO (DIO = dose infectieuse pour 50% des embryons) on peut prétendre qu'il existe une grande stabilité qualitative et quantitative intra-lots, et que par conséquent il n'est pas nécessaire de procéder à la titration systématique du virus provenant des même lots de vaccin (il est ainsi possible

Tableau 2: relation entre l'inverse du titre IH et l'inverse du titre ELISA: coefficient de corrélation (R-squared) et équation de la droite de régression.



de sensibiliser un grand nombre de plaques microtiter en titrant une seule fois le virus).

- Les érythrocytes frais de coq, parfois difficiles à obtenir, ne sont plus nécessaire.
- Les sérums auto-agglutinants lors de l'IH ne présentent plus de problèmes avec l'ELISA.
- La lecture des résultats, demandant une certaine habitude avec l'IH, est plus aisée. Les différences d'intensité de la coloration du substrat sont tout à fait visible à l'œil nu, dès lors le résultat peut être immédiatement estimé sans avoir recours à un spectrophotomètre.
- Les plaques sensibilisées avec l'Ag se gardent en tous cas 12 mois à 4 °C et certainement au-delà (non encore testé).

Le fait que l'on ne connaisse pas de manière précise la variation quantitative du taux d'anticorps n'est pas gênant. Seul est important le fait que ce taux diminue, prouvant ainsi que l'immunité des poussins baisse avec l'âge, et que par conséquent ces derniers ne sont pas infectés par le virus de la NCD.

L'analyse annexe montrant une bonne corrélation entre l'IH et l'ELISA prouve que cette dernière méthode est fiable.

BIBLIOGRAPHIE

Engvall E., Perlmann P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–874. — Snyder D. B., Marguadt W. W., Mallinson E. T., Russek E. (1983): Rapid serological profiling by Enzyme-linked immunosorbent assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. *Avian diseases* 27, 161–170. — Voller A., Bidwell D., Bartlett A. (1980): Enzyme-linked immunosorbent assay. In *Manual of clinical immunology*. N. R. Rose and H. Friedman, eds. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 359–371. — Wilson R. A., Perrotta C. Jr., Frey Betsy, Eckroade R. J. (1984): An Enzyme-linked

immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. *Avian Diseases* 28, 1079–1085.

Newcastle disease: La prova enzyme-linked immunosorbent per sorvegliare gli anticorpi nei pulcini

E' stata messa a punto la prova di ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizzando come antigene una cultura vaccinale del virus della malattia di Newcastle. Questa alternativa all'inibizione dell'emoagglutinazione (IH) permette di sorvegliare la caduta del tasso degli anticorpi materni nei pulcini fra il 1° e il 28 esimo giorno. Uno studio comparativo ha mostrato una buona correlazione fra l'ELISA e l'IH.

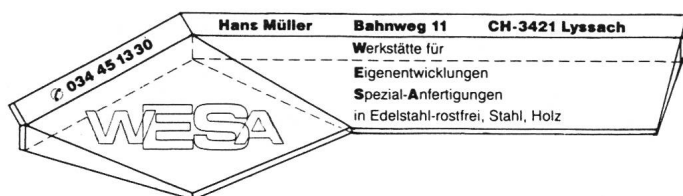
Newcastle disease: Ein Enzyme-linked-immunosorbent-Test zur Bestimmung der Antikörper beim Geflügel

Ein Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in dem als Antigen ein Impfstamm der Newcastle-Krankheit verwendet worden ist, wird beschrieben. Er erlaubt die Überwachung des Titerabfalls mütterlicher Antikörper bei 1 und 28 Tage alten Hühnerküken und kann als Alternative zur Hämagglutinationshemmung (HAH) gebraucht werden.

Eine vergleichende Studie hat eine gute Korrelation zwischen ELISA und HAH aufgezeigt.

Adresse: Anne Oppliger
Institut Galli-Valerio
César-Roux 37
CH-1014 Lausanne

Manuskripteingang: 15. Januar 1991



Die Qualität aus Holz

WESA-Autoapotheken

In unserer Werkstatt werden für Sie noch weitere Produkte hergestellt.
Ihre Werkstatt für Einzel-Anfertigungen

