

ANALYSE DE DIVERS FACTEURS INFLUENÇANT LES TITRAGES DU VIRUS HERPÈS DINDON

G. MEULEMANS, P. HALEN, P. SCHYNS et H. VINDEVOGEL*
avec la collaboration technique de P. BOURGUEIL

*Institut national de Recherches vétérinaires,
Département de Pathologie aviaire,
99, Groeselenberg,
1180 Bruxelles (Belgique)*

** Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège,
45, Rue des Vétérinaires,
1070 Bruxelles (Belgique)*

RÉSUMÉ

L'incidence des facteurs cellulaires et viraux sur la sensibilité des titrages de virus Herpès dindon est étudiée. La nature et l'âge des cultures cellulaires, la nature du diluant, le volume de l'inoculum viral, la température et la durée de la période d'adsorption, la température et la durée d'incubation des cultures cellulaires sont les divers paramètres qui influencent les résultats obtenus.

Une méthode de titrage du virus Herpès dindon est proposée. Elle consiste en l'inoculation de cultures primaires de fibroblastes de poussins, âgés de 18 à 24 heures, au moyen d'un volume de 0,05 ml de virus dilué en tampon SPGA. L'adsorption de l'inoculum viral est effectuée durant 60 minutes à 22°C. Les cultures cellulaires sont ensuite rincées et recouvertes de milieu gélosé, puis incubées à 38,5°C durant 6 jours.

INTRODUCTION

L'utilisation intensive de virus Herpès dindon (HVT) sous forme lyophilisée pour la prévention de la maladie de Marek motive assurément la recherche d'une standardisation des méthodes de contrôle des vaccins préparés à partir de cette souche virale.

Le but de nos expérimentations est de mesurer l'influence de divers paramètres sur la sensibilité des titrages du virus HVT et, tenant compte des résultats obtenus, de proposer une méthode de titrage de ce virus.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

A. — Cultures de fibroblastes d'embryons de poulet

Les cultures primaires sont réalisées par trypsination d'embryons de 9 jours à 37°C ; les cellules embryonnaires sont ensemencées à une concentration de 750 000 cellules par ml de milieu.

Les cultures secondaires s'obtiennent par trypsination du tapis de la culture primaire (trypsine 0,3 g, EDTA 0,3 g dans 100 ml de PBS) ; les cellules décollées sont recueillies, centrifugées à 100 g pendant 10 minutes et ensemencées à raison de 450 000 cellules par ml de milieu. Les concentrations cellulaires utilisées pour la préparation des cultures nous permettent d'obtenir une couche monocellulaire régulière dans les 18 heures qui suivent la mise en culture.

Le milieu de croissance consiste en la solution de Eagle à double concentration en acides aminés et vitamines, additionnée de 3 p. 100 de sérum de veau fœtal, de 10 p. 100 de bouillon tryptose et d'une solution d'antibiotiques (Pénicilline 10⁶ UI, Streptomycine 50 mg, Tylosine 2,5 mg, Natamycine 0,1 mg/100 ml). Le milieu est amené à pH 7,2 au moyen d'une solution de bicarbonate de soude (7,5 p. 100 dans de l'eau désionisée). Le lendemain de l'ensemencement, le milieu est renouvelé afin, d'une part d'éliminer les cellules qui n'adhèrent pas à la paroi, d'autre part de réduire à 1 p. 100 la teneur en sérum ; dans certaines expérimentations ce milieu est additionné d'agarose (0,8 p. 100).

Les cultures sont effectuées soit en boîtes de Roux (100 ml de suspension cellulaire par boîte), soit en boîtes de Pétri⁽¹⁾ de 6 cm de diamètre (5 ml de suspension cellulaire par boîte).

B — Virus

La souche virale utilisée est la souche FC 126 reçue sous sa forme cellulaire du Dr N. Zygraich⁽²⁾. La multiplication de la souche virale est réalisée par l'inoculation de fibroblastes en culture primaire. Environ 10⁶ unités formant plages (UFP) sont inoculées sur une couche monocellulaire en boîtes de Roux. Après 72 heures d'incubation, les cellules inoculées sont trypsinées et remises en culture durant 48 heures. A ce moment, 80 p. 100 des cellules inoculées ont subi la transformation virale ; le virus HVT est alors extrait des cellules selon la technique de CALNEK *et al.* (1970). En bref, les cellules transformées sont récoltées par agitation mécanique et centrifugées (100 g pendant 10 mn), le culot de centrifugation est mis en suspension dans du tampon SPGA à raison de 10^{7,5} cellules par ml de tampon. La suspension cellulaire ainsi réalisée est soumise aux ultra-sons pendant 2 minutes, centrifugée (3 000 g, 10 mn) afin d'éliminer les débris cellulaires, répartie en flacons (1 ml par flacon) et lyophilisée. Le virus lyophilisé est conservé à 4°C.

C. — Méthode de titrage

Toutes les manipulations de titrage sont effectuées en boîtes de Petri de 60 mm selon une technique de base modifiée en fonction des résultats de nos diverses expérimentations. Le virus est mis en solution et dilué en tampon SPGA. Au moment de l'inoculation, on enlève le milieu des cultures cellulaires et les couches monocellulaires convenablement asséchées sont inoculées au moyen de 0,05 ml de dilution virale. Chaque dilution est inoculée sur 5 boîtes de Pétri.

Après une période d'adsorption d'une heure à 22°C, les cultures sont lavées, puis recouvertes de milieu d'entretien contenant ou non de l'agarose. Les cultures cellulaires sont ensuite incubées à 38,5°C en atmosphère humide et sous 5 p. 100 de CO₂. Après un délai variable, selon les expérimentations, les couches monocellulaires sont colorées au May-Grunwald-Giemsa ; les cultures effectuées sous milieu gélosé sont préalablement fixées au formol à 10 p. 100 pendant une heure et colorées après enlèvement de la gélose.

(1) Falcon Plastics

(2) Département de Biologie, Recherche et Industrie thérapeutiques. B. 1330, Rixensart (Belgique).

Les plages sont comptées au microscope inversé (grossissement 20 fois). Le titre viral est évalué en calculant la moyenne géométrique du nombre de plages observées dans cinq boîtes d'une même dilution virale pour laquelle on observe au moins 20 et au plus 150 plages par boîte. Le titre est ensuite exprimé en \log_{10} par ml.

D. — *Protocole expérimental*

Nous avons étudié l'incidence des facteurs cellulaires (nature et âge des cellules ; température et durée d'incubation des cultures) et viraux (nature et température du diluant, durée et température d'adsorption, volume de l'inoculum) sur la sensibilité des titrages de virus HVT. Chaque expérimentation a été effectuée trois fois au moins afin de s'assurer que les résultats obtenus sont reproductibles. Seules des différences de titre de $0,2 \log_{10}$ au moins ont été considérées comme significatives.

RÉSULTATS

A. — *Nature et âge des cultures au moment de l'inoculation*

Nous avons comparé la sensibilité de fibroblastes en culture primaire ou secondaire inoculés 18, 24, 48 et 72 heures après la mise en culture. Les cultures primaires sont plus réceptives que les cultures secondaires. La différence de sensibilité entre les deux types cellulaires est particulièrement importante pour des cultures âgées de 18 heures au moment de l'inoculation ($0,7 \log_{10}$ en moyenne). Le titre sur cultures primaires reste pratiquement constant durant les premières 48 heures mais, passé ce délai, il décroît fortement ($0,5 \log_{10}$ en moyenne). A l'inverse du phénomène observé pour les cultures primaires, les titres obtenus sur cellules secondaires augmentent avec l'âge des cellules de telle sorte que la sensibilité des cellules secondaires âgées de 72 heures équivaut à celle des cellules primaires du même âge (tabl. I).

TABLEAU I

Influence de la nature et de l'âge des cellules sur le titre viral

	Expér. n°	Age des cellules au moment de l'inoculation			
		18 h	24 h	48 h	72 h
A. Cellules primaires	1	6,5*	6,5	6,6	6,1
	2	6,7	6,6	6,5	6,1
	3	6,7	6,6	6,3	6,1
	4	6,5	6,5	6,5	6,1
B. Cellules secondaires	1	5,8	5,9	6,0	6,2
	2	5,8	5,7	6,0	6,1
	3	5,7	5,9	6,0	6,2
	4	6,0	6,1	6,2	6,3

* \log_{10} par ml.

B. — *Nature du diluant*

Le virus lyophilisé est dilué dans diverses solutions à pH 7,2 à savoir : SPGA, NaCl tamponné à 8,5 p. 1 000 (SPT) et milieu de Eagle additionné ou non de sérum foetal bovin (3 p. 100). Afin d'évaluer le pouvoir protecteur de ces différents diluants, nous avons placé les dilutions virales pendant une heure au bain-marie à 38,5°C avant de procéder à l'inoculation sur cellules. Les résultats obtenus figurent au tableau 2 et montrent clairement la supériorité du SPGA sur les autres diluants. Les titres les moins élevés sont obtenus en utilisant du SPT.

TABLEAU 2

Influence de la nature du diluant sur le titre viral

Expérience n°	Nature du diluant			
	SPGA	SPT	Eagle	Eagle + 3 p. 100 sérum foetal
1	6,3*	5,2	5,5	5,7
2	6,5	5,3	5,6	6,1
3	6,3	5,2	5,2	5,6

* Log₁₀ par ml.C. — *Température du diluant lors de la mise en solution du virus*

Les titres obtenus lors d'utilisation de SPGA à 4°, 22° ou 38,5°C ne nous permettent pas de conclure à l'existence d'une température optimale pour la mise en solution du virus (tabl. 3).

TABLEAU 3

Influence de la température du diluant sur le titre viral

Expérience n°	Température du diluant		
	4°C	22°C	38,5°C
1	6,4*	6,4	6,4
2	6,4	6,3	6,2
3	6,6	6,6	6,6

* Log₁₀ par ml.

D. — *Durée d'adsorption*

Afin de rechercher l'influence de l'adsorption sur le titre viral, nous avons inoculé les cultures, soit directement dans le milieu sans procéder à l'adsorption, soit après assèchement complet de la couche monocellulaire et adsorption de l'inoculum viral pendant 10, 30 ou 60 minutes.

Les titres obtenus sans adsorption sont, en moyenne, inférieurs de 0,6 \log_{10} à ceux observés après adsorption de l'inoculum viral pendant 10 minutes. La prolongation de la période d'adsorption jusqu'à 60 minutes permet d'augmenter encore le titre viral qui est alors supérieur de 0,9 \log_{10} en moyenne à celui obtenu sans adsorption (tabl. 4).

TABLEAU 4

Influence de la durée d'adsorption sur le titre viral

Expérience n°	Durée d'adsorption			
	Néant	10 mn	30 mn	60 mn
1	5,6*	6,3	6,4	6,5
2	5,5	6,1	6,2	6,3
3	5,6	6,2	6,3	6,5

* \log_{10} par ml.

E. — *Volume de l'inoculum*

Nous avons comparé les titres obtenus après l'inoculation des cultures au moyen de différents volumes d'une même dilution virale. Les volumes testés sont respectivement 0,05 ; 0,1 ; 0,2 et 1 ml. Le titre obtenu est d'autant plus élevé que le volume inoculé est faible et il décroît régulièrement lorsque le volume de l'inoculum passe de 0,05 à 0,1 ; 0,2 et 1 ml (tabl. 5).

TABLEAU 5

Influence du volume de l'inoculum sur le titre viral

Expérience n°	Volume de l'inoculum				
	0,05 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,5 ml	1 ml
1	6,6*	6,4	6,2	5,8	5,6
2	6,4	6,2	6,1	5,7	5,6
3	6,5	6,3	6,1	5,9	5,7

* \log_{10} par ml.

F. — *Température d'adsorption*

L'inoculum viral est adsorbé pendant une heure, soit à 22°C, soit à 38,5°C. Les cultures cellulaires sont ensuite incubées à 38,5°C. Nous obtenons régulièrement des titres plus élevés lorsque l'adsorption est effectuée à 22°C plutôt qu'à 38,5°C. La différence observée est de l'ordre de 0,2 log₁₀ (tabl. 6).

TABLEAU 6

Influence de la température d'adsorption sur le titre viral

Expérience n°	Température d'adsorption	
	22°C	38,5°C
1	6,5*	6,3
2	6,4	6,1
3	6,6	6,3

* Log₁₀ par ml.

G. — *Température d'incubation des cultures*

Les titres obtenus après incubation des cultures à 38,5°C sont plus élevés que lors d'incubation à 37°C. La différence observée est de 0,2 log₁₀ en moyenne (tabl. 7).

TABLEAU 7

Influence de la température d'incubation des cellules sur le titre viral

Expérience n°	Température d'incubation des cellules	
	37°C	38,5°C
1	6,3*	6,5
2	6,1	6,4
3	6,2	6,5
4	6,3	6,5

* Log₁₀ par ml.

H. — *Durée d'incubation des cultures*

Nous avons comparé les titres obtenus sous milieu liquide ou milieu gélosé lorsque l'incubation des cultures inoculées est prolongée pendant des délais variables : 3, 4, 5, 6 et 7 jours. Sous milieu gélosé, le titre reste constant entre le 4^e et le 7^e jour.

Il n'en est pas de même pour les cultures maintenues sous milieu liquide pour lesquelles une augmentation constante du titre est observée. Cette augmentation est due à la formation de plages secondaires qui apparaissent principalement après le 4^e jour d'incubation (tabl. 8).

TABLEAU 8

Influence de la durée d'incubation des cultures sur le titre viral

	Expér. n°	Durée d'incubation des cultures				
		3 jours	4 jours	5 jours	6 jours	7 jours
Cultures sous milieu liquide	1	6,4*	6,7	6,9	7,4	7,6
	2	6,5	6,8	6,9	7,3	7,5
	3	6,3	6,6	6,8	7,3	7,5
Cultures sous agarose	1	—	6,6	6,6	6,6	6,6
	2	—	6,6	6,6	6,6	6,6
	3	—	6,6	6,6	6,6	6,6

* Log₁₀ par ml.

Nous constatons également que le titre obtenu sous milieu gélosé au 7^e jour est très semblable à celui observé sous milieu liquide après 4 jours d'incubation.

DISCUSSION

Les résultats obtenus prouvent l'importance de nombreux facteurs d'origine cellulaire et virale sur les titrages de virus HVT.

BASARAB *et al.* (1973) signalent et nos expérimentations confirment que les cellules primaires âgées de 18 ou 24 heures sont plus sensibles que les cellules secondaires du même âge. Ces observations s'opposent aux conclusions de PATRASCU et CALNEK (1972) et LODETTI *et al.* (1972) qui jugent les cultures secondaires aussi sensibles que les cultures primaires.

Déjà signalée par PATRASCU et CALNEK (1972) et BASARAB *et al.* (1973), la baisse de sensibilité des cultures primaires est fonction de l'âge des cellules ; dans nos expérimentations, elle est particulièrement importante entre la 48^e et la 72^e heure.

D'accord avec PATRASCU et CALNEK (1972) et BASARAB *et al.* (1973), nous estimons également que le SPGA est le diluant qui protège le plus efficacement le virus lyophilisé lors de sa mise en solution. Cependant, contrairement à BASARAB *et al.* (1973), nous n'avons pu mettre en évidence aucune relation entre la température du diluant au moment de la mise en solution du virus et le titre obtenu en cultures cellulaires.

CALNEK *et al.* (1972) et BENNEJEAN (1973) préconisent l'inoculation d'un volume de 0,05 ml par boîte de Pétri de 60 mm. Nos expérimentations démontrent également qu'il s'agit là du volume le plus favorable à l'obtention d'un titre optimum.

La nécessité d'une période d'adsorption a été soulignée par tous les auteurs. Cependant, les avis sont assez divergents en ce qui concerne sa durée et la température à laquelle elle doit être effectuée.

Nos résultats montrent qu'une adsorption d'une heure à 22°C donne de meilleurs résultats que l'adsorption à 38,5°C pendant 30 minutes, méthode recommandée par CALNEK *et al.* (1972) et BENNEJEAN (1973). L'adsorption à 22°C est d'ailleurs recommandée par BASARAB *et al.* (1973) qui prolongent cependant la période d'adsorption durant 90 minutes. PATRASCU et CALNEK (1972) ont démontré comme nous que l'adsorption virale est déjà très importante après 10 minutes et qu'elle n'est pas totale après 60 minutes ; ils estiment également que la prolongation de la période d'adsorption au-delà de 60 minutes peut nuire aux cellules et que le gain de titre ainsi obtenu est minime.

Contrairement à BASARAB *et al.* (1973) et KALETA (1973) qui recommandent d'incuber les cultures cellulaires à 37°C, PATRASCU et CALNEK (1972) et CALNEK *et al.* (1972) prescrivent une température d'incubation comprise entre 38 et 39°C. Nos expérimentations prouvent également la plus grande sensibilité des titrages effectués à 38,5°C.

La durée d'incubation des cultures est présentement le point le plus controversé des titrages de virus HVT.

Travaillant sous milieu liquide, BENNEJEAN (1973) recommande de procéder à la lecture 3 jours après l'inoculation ; CALNEK *et al.* (1972), BASARAB *et al.* (1973), KALETA (1973), 5 jours après l'inoculation. Nos expériences confirment les résultats de VON BULOW (1973) qui signale que lorsque les cultures cellulaires sont maintenues sous milieu liquide, des plages secondaires apparaissent dès le 4^e jour après l'inoculation. Cet auteur a dès lors recommandé l'utilisation d'un milieu gélosé qui empêche la formation des plages secondaires, la lecture étant alors effectuée 6 jours après l'inoculation.

En conclusion, la méthode de titrage qui nous semble la plus sensible et la plus reproductible consiste en l'inoculation de fibroblastes en culture primaire âgés de 18 à 24 heures. Les cultures cellulaires effectuées en boîtes de Pétri de 60 mm sont inoculées au moyen d'un volume de 0,05 ml de virus dilué en tampon SPGA. L'inoculum viral est déposé sur les couches monocellulaires convenablement asséchées au préalable et l'adsorption est effectuée durant 60 minutes à 22°C.

Les cultures cellulaires sont ensuite rincées et recouvertes de milieu gélosé de maintenance puis incubées à 38,5°C en atmosphère humide et sous 5 p. 100 de CO₂ durant 6 jours. Passé ce délai, les cultures sont fixées au formol à 10 p. 100 et colorées au May-Grunwald-Giemsa après enlèvement de la gélose. Les plages sont alors dénombrées par comptage au microscope inversé (grossissement 20).

SUMMARY

AN ANALYSIS OF VARIOUS FACTORS WHICH INFLUENCE
THE TITRE OF TURKEY HERPES VIRUS

The effect of cellular and viral factors on the sensitivity of the titration of turkey Herpes virus was studied.

The nature and age of the cell cultures, the composition of the diluent, the volume of the viral inoculum, the temperature and duration of the adsorption period, the temperature and the incubation period of the cell cultures are various factors which affect the results obtained.

A method for the titration of turkey herpes virus is put forward. It consists of the inoculation of 18-24 hour primary culture chick fibroblasts with an inoculum of 0.05 ml of viral dilutions made in SPGA buffer. Adsorption of the viral inoculum is carried out at 22°C for one hour. The cell cultures are then rinsed, covered with an agar medium and further incubated at 38.5°C for six days.

РЕЗЮМЕ

Анализ влияния разных факторов на титры вируса пузырьчатого лишая индюка.

Изучается влияние клеточных и вирусных факторов на чувствительность титров вируса пузырьчатого лишая индюка.

Свойства и возраст клеточных культур, свойства разбавителя, объём инокулируемого вируса, температура и продолжительность адсорбции, температура и продолжительность инкубационного периода клеточных культур имеют влияние на полученные результаты.

Предлагается метод титрования вируса пузырьчатого лишая индюка. Первичные культуры фибробластов восемнадцати двадцатьчетырехчасовых цыплят инокулируют с помощью объёма 0,05 мл вируса, разжиженного буфером СПГА. Адсорбция инокулируемого вируса продолжается шестьдесят минут с температурой 22°. Потом, промывают клеточные культуры, покрывают их средней агар-агара и оставляют в инкубаторе шесть дней с температурой 38,5°.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BASARAB O., FERRIS R. D., KELLY A. D., 1973. The *in vitro* assay of herpes virus turkey vaccines. *Symposium sur la standardisation des vaccins aviaires*, Lyon, France.
- BENNEJEAN G., 1973. Titration of cell free lyophilized vaccines against Marek's disease. *Symposium sur la standardisation des vaccins aviaires*, Lyon, France.
- CALNEK B. W., HITCHNER S. B., ADLINGER V. H., 1970. Lyophilization of cell-free Marek's disease herpes virus and a herpes virus from turkeys. *Appl. Microbiol.*, **20**, 723-726.
- CALNEK B. W., GARRIDO C., OKAZAKI W., PATRUSCU I. V., 1972. *In vitro* methods for assay of turkey herpes virus. *Avian Dis.*, **16**, 52-56.
- KALETA E. F., 1973. Methods for the titration of turkey herpes virus in vaccines against Marek's disease. *Symposium sur la standardisation des vaccins aviaires*, Lyon, France.
- LODETTI E., LODRINI E., GUALANDI G. L., CESSI D., 1972. Esperimenti sullo titolazione *in vitro* dell herpes virus dell tacchino (HVT). *La Nuova veter.*, **5**, 295-300.
- PATRASCU I. V., CALNEK B. W., 1972. *In vitro* assay of cell-free turkey herpes virus. *Avian Dis.*, **16**, 397-413.
- VON BULOW V., LORENZ R. J., 1973. Plaque assay of turkey herpes virus and attenuated Marek's disease virus. *Zbl. Veter.-Med. B.*, **20**, 161-165.