

Modifications techniques du test intrapéritonéal de protection amarile chez la souris

PAR

Louis van den BERGHE

Près de mille épreuves de séroprotection amarile chez la souris ont été effectuées dans le service chargé de l'étude de la fièvre jaune à l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold. Pour les enquêtes endémiologiques dans une région donnée ou les études épidémiologiques autour d'un cas suspect aussi bien que pour le contrôle de vaccination, l'épreuve intrapéritonéale de six souris suivant Sawyer a seule été utilisée. Cette épreuve m'a toujours semblé plus sûre dans la routine, que celle intracérébrale de quatre souris suivant Theiler. Aussi n'ai-je utilisé cette dernière épreuve qu'à titre de contrôle ou pour l'étude plus détaillée de tel sérum, notamment vis-à-vis de dilutions croissantes de virus (1/1.000 et 1/10.000).

Depuis cinq ans que le test de protection amarile intrapéritonéal suivant Sawyer est appliqué à l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, diverses modifications concernant la technique et l'instrumentation ont été introduites dans le but de rendre les opérations plus rapides et correctes et aussi d'augmenter la sécurité de l'épreuve en ce qui concerne les sérums positifs. Les 150 dernières épreuves que j'ai pratiquées bénéficient de l'ensemble de ces modifications, et de nombreux contrôles, tant par l'épreuve de Sawyer originale que par l'épreuve de Theiler, me permettent d'affirmer que celles-ci représentent des perfectionnements appréciables. Il est par ailleurs utile d'indiquer avec le plus de précision possible de quelle façon les

tests de protection amarile sont effectués. Les résultats obtenus en des endroits divers pourront être dès lors mieux comparés, en particulier lorsqu'ils se rapportent aux mêmes sérums, ou à des sérums provenant d'une même région.

Voici l'exposé des divers temps de manipulation de l'épreuve de protection intrapéritonéale :

1. — *Choix des souris et anesthésie.*

Je n'ai pas observé vis-à-vis du virus de la fièvre jaune de sensibilité particulière chez les souris provenant de l'un ou l'autre élevage, et je n'attache ainsi provisoirement que peu d'importance à la sélection des souris sur laquelle les auteurs anglo-saxons insistent particulièrement. Dans mon expérience, toutes les fois que des pourcentages relativement faibles de souris mouraient, il s'agissait d'une atténuation du virus utilisé plutôt que d'une résistance particulière des souris. Les souris d'une taille moyenne, pesant de 13 à 14 grammes, me paraissent de beaucoup préférables aux souris plus grosses. Elles supportent notamment beaucoup mieux l'anesthésie. Celle-ci s'effectue à l'éther dans un grand récipient cylindrique en verre sans couvercle. Un faux fond en zinc perforé sépare les souris soumises à l'anesthésie de l'ouate disposée sur le fond du récipient et arrosée d'éther.

2. — *Injection préparatrice intracérébrale.*

Pour la taille de souris utilisée, il est préférable de n'injecter dans le cerveau qu'un volume de 0.02 cc. de la suspension d'amidon à 2 p. c. L'injection se fait dans l'hémisphère gauche, l'aiguille étant poussée perpendiculairement en évitant la ligne médiane (hémorragie du sinus longitudinal), une région trop antérieure (hémorragies nasales) ou une région trop postérieure (troubles cérébelleux). Afin de rendre l'injection aussi régulière que possible, les aiguilles du calibre 5/10 sont raccourcies à la longueur de 5 mm., ce qui permet d'enfoncer l'aiguille à fond et partant d'atteindre rigoureusement toujours

la même profondeur. J'ai, d'autre part, apprécié en ce qui concerne la seringue, un dispositif employé à Amsterdam (Schüffner). Une virole est ajustée sur l'axe fileté du piston d'une seringue à tuberculine et réglée de telle façon qu'un tour complet correspond à 0.02 cc. A chaque injection il suffit ainsi de dévisser la virole d'un tour, puis de pousser le piston jusqu'à résistance pour injecter 0.02 cc. sans possibilité d'erreur ni difficulté de lecture des graduations.

3. — *Injection intrapéritonéale et mélange sérum-virus.*

Suivant la technique originale, le test de Sawyer se pratique sur six souris, chaque souris recevant dans la cavité cœlomique une injection de 0.6 cc. constituée par un mélange de 0.04 cc. du sérum à examiner et 0.2 cc. d'une suspension de virus neurotrope (cerveau de souris à 20 p. c. dans l'eau peptonée à 1 ‰, additionné de 10 p. c. de sérum non immun pour la protection du virus). Plutôt que d'injecter 0.6 cc., volume difficile à lire sur une seringue à graduations normales, j'ai toujours trouvé préférable d'injecter 0.5 cc. Dans une seringue de 5 cc., 3.5 cc. du mélange sont aspirés dont 3.0 cc. serviront aux six injections et 0.5 cc. sera maintenu en réserve. Au cours d'une séance de manipulations, il faut autant de seringues de 5 cc. qu'il y a de tests, et après injection les seringues sont conservées pendant une demi-heure environ, ce qui permet avec les 0.5 cc. restant dans chacune d'elles de reconstituer les lots de six souris après décès accidentel de l'une d'elles.

L'élément le plus important du test intrapéritonéal est constitué par le mélange sérum-virus. Il est surtout souhaitable d'exiger plus de rigueur pour les tests positifs de protection. A la suite de Findlay qui applique le test de Sawyer en diluant le sérum à 1/8, j'ai introduit la technique suivante :

Avec la seringue de 5 cc. je prélève 0.5 cc. du sérum à examiner et j'aspire ensuite 3.0 cc. d'une suspension de virus neurotrope. Le volume total se trouve ainsi être de 3.5 cc. et la dilution du sérum de 1/7. La suspension de virus neurotrope est calculée de telle façon que le pourcentage final après adjon-

tion des 0.5 cc. de sérum aux 3.0 cc., soit de 10 p. c. ou de 20 p. c., le premier pourcentage réalisant une économie de cerveaux de souris sans différence appréciable dans la sensibilité du test. Partant du poids moyen de 0.2 gr. pour un cerveau de souris, les calculs permettent d'établir qu'il faut ajouter 4,97 cc. d'eau peptonée à chaque cerveau pour obtenir une suspension finale de 10 p. c. et 2,375 cc. pour obtenir une suspension à 20 p. c. Ces chiffres sont arrondis pour la facilité à 5 cc. et 2.5 cc. Le tableau suivant indique le nombre de centimètres cubes qu'il faut ajouter pour l'une et l'autre suspension à des nombres croissants de cerveaux, ainsi que le nombre de cerveaux et le volume de suspension dont il faut disposer pour des nombres croissants de tests.

Nombres de tests à pratiquer	Nombre de cc de suspension de virus nécessaires	Suspension de virus à 20 ‰		Suspension de virus à 10 ‰	
		Nombre de cerveaux de souris à mettre en suspension	Nombre de cc d'eau pepton. à 1 ‰ addit. de sérum	Nombre de cc cerveaux de souris à mettre en suspension	Nombre de cc d'eau pepton. à 1 ‰ addit. de sérum
1	3	2	5	1	5
2	6	3	7.5	2	10
3	9	4	10	2	10
4	12	6	15	3	15
5	15	7	17.5	4	20
6	18	8	20	4	20
7	21	9	22.5	5	25
8	24	10	25	5	25
9	27	12	30	6	30
10	30	13	32.5	7	35
11	33	14	35	8	40
12	36	16	40	8	40

Voici comment dans la pratique les opérations se succèdent :

1. Un nombre de cerveaux de souris atteintes d'encéphalite amarile (souche française neurotrope) correspondant au nombre de tests à effectuer est placé dans un flacon stérile en verre de 100 cc. avec bouchon rodé et perles de verre. Le broyage des cerveaux est parfaitement réussi par agitation des perles, puis l'on ajoute le nombre de centimètres cubes d'eau peptonée requis d'après le tableau pour obtenir la suspension de virus à 10 p. c. ou 20 p. c. Les risques d'infection au cours de cette manipulation sont beaucoup moindres que lors du broyage en mortier ouvert à l'aide d'un pilon ou d'une brosse, tel qu'il se pratique ailleurs.

2. On prend autant de seringues de 5 cc. qu'il y a de tests à pratiquer et dans chaque seringue on aspire d'abord 0.5 cc. du sérum à examiner, puis 3.0 cc. de la suspension prélevée dans le flacon.

3. Quand toutes les seringues sont garnies, on procède aux injections des lots de six souris, un demi-centimètre cube du mélange étant gardé en réserve pendant une demi-heure dans chaque seringue pour une inoculation éventuelle à une souris de remplacement.

4. — Contrôles.

Dans toute série de tests de protection, il est indispensable d'introduire un contrôle négatif avec du sérum de lapin normal et un contrôle positif avec du sérum de lapin immunisé. Les tests ne sont interprétés que si quatre, cinq ou six souris meurent sur six pour le contrôle négatif (4/6, 5/6, 6/6) et si zéro ou une souris meurt sur les six pour le contrôle positif (0/6, 1/6).

De plus, à la fin de toutes les inoculations intrapéritonéales des souris, un contrôle de la virulence est effectué en inoculant six souris dans le cerveau avec une suspension de virus contenue dans le flacon de verre et diluée à 1/1000. Il est bon de pratiquer de temps à autre un dosage du virus, celui-ci

devant pour la bonne interprétation des épreuves tuer la moitié des souris à une dilution de 1/100.000. Enfin, cette même suspension subit à la fin de toutes les manipulations un contrôle de stérilité sur milieux aérobie et anaérobie.

CONCLUSIONS.

Les 150 derniers tests intrapéritonéaux de protection amarile chez la souris ont été effectués par une modification de la technique de Sawyer qui présente les avantages suivants :

1° Les exigences sont accrues en ce qui concerne la réaction positive des tests de protection, grâce à la dilution de 1/7 du sérum à examiner. L'utilisation d'une suspension de virus à 20 p. c. plutôt qu'à 10 p. c. offre des garanties supplémentaires à ce même point de vue ;

2° L'utilisation d'une faible quantité de sérum permet dans la plupart des cas la reprise d'un test de protection au cas où une première épreuve aurait été douteuse ;

3° La mise en suspension du virus et la réalisation du mélange virus-sérum se fait dans le minimum de temps (une équipe de deux personnes exécute 12 tests en une heure et demie), et avec une sécurité accrue en ce qui concerne les contaminations extérieures possibles ;

4° La photographie ci-jointe illustre les caractéristiques de notre outillage : le bocal à anesthésie, la petite seringue à virole mobile et les fines aiguilles raccourcies pour l'injection intracérébrale, le flacon de verre pour la mise en suspension du virus, et la seringue de 5 cc. pour l'injection intrapéritonéale.

*Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold,
Anvers.*

