

**Application de la méthode d'immuno-diffusion  
en gélose au diagnostic expérimental d'infections  
à *Herpesvirus bovis* chez les Bovins  
(Rhinotrachéite infectieuse chez le veau,  
Balanoposthite chez le taureau)**

par A. CHARTON, P. FAYE, Cl. LE LAYEC

---

L'épreuve sérologique, dans le diagnostic étiologique expérimental indirect des infections bovines à *Herpesvirus bovis* (rhinotrachéite infectieuse, exanthème coïtal, balanoposthite...) peut faire appel à diverses méthodes et, principalement, à la séro-neutralisation, à la déviation du complément, à l'immuno-diffusion en gélose. Les résultats d'une étude expérimentale antérieure nous ont conduits à chercher si cette dernière méthode, plus simple que les précédentes, aisément applicable au contrôle de nombreux échantillons de sérums, pouvait être utilisée pour le diagnostic courant de l'infection chez les Bovins.

Les antigènes précipitants concentrés utilisés ici sont préparés à partir des milieux de maintien de cultures de cellules de rein d'embryon de veau, ou de testicule de veau, inoculés avec diverses souches : HB1, HB2 d'*Herpesvirus bovis*, isolées au Laboratoire de sécrétions nasales ou de poumons de veaux atteints de rhinotrachéite infectieuse ; une souche I. P. V. provenant d'exanthème coïtal de l' « American type culture collection ». La préparation comporte les temps suivants : multiplication du virus en cultures cellulaires (rein, testicule ou muscle de veau ou d'agneau embryonnaires) ; clarification des surnageants infectieux par centrifugation à froid à bas régime ; concentration par précipitation de la totalité des protéines, virales ou non, contenues dans le milieu par le sulfate d'ammoniaque à demi-saturation ; reprise du précipité en Tampon Tris-EDTA en volume égal au

1/100 du volume d'origine ; ajustement du pH et de la concentration saline par dialyse à froid contre un sérum physiologique tamponné (0,01 M phosphates, pH 7,2). Les antigènes destinés à la sérologie sont inactivés par l'acide phénique à 5 p. 1000. Les antigènes utilisés pour l'hyperimmunisation des sujets fournissant les sérums de référence sont préparés selon la même méthode. Mais, si l'antigène destiné au veau est cultivé sur cellules d'embryon de veau et non concentré (inoculation nasale), l'antigène destiné au lapin est cultivé sur cellules embryonnaires d'agneau.

— Les sérums de référence proviennent :

a) D'un lot de six lapins recevant cinq inoculations successives (intrapéritonéale, sous-cutanée, intraveineuses) d'antigène concentré ; les saignées sont répétées du 10<sup>e</sup> au 60<sup>e</sup> jour suivant la première injection de virus vivant. Les sérums sont répartis en ampoules et conservés à + 4°.

— Le sérum des lapins témoins est récolté et conservé dans les mêmes conditions.

b) D'une génisse, inoculée à 4 mois, par voie nasale, par nébulisation de 20 ml d'une suspension de virus I. B. R. infectieux (titrant 10<sup>6</sup> particules infectantes/ml).

c) De cinq taureaux d'insémination artificielle : Ces sérums sont choisis dans un lot de sérums testés en vue du contrôle sanitaire, positifs en séro-neutralisation.

— Les sérums bovins étudiés proviennent :

a) Pour 120 paires d'échantillons, de taureaux entretenus dans divers centres d'insémination artificielle dans lesquels ont été observés d'assez nombreux cas de balanoposthite imputables à une infection par le virus « I. P. V. ». Pour chaque sujet, la paire de sérums correspond à deux saignées pratiquées à deux semaines d'intervalle.

b) Pour 33 paires, de veaux, de quelques semaines à quelques mois, d'élevages cliniquement suspects de rhinotrachéite infectieuse enzootique.

— Les tests d'immuno-diffusion sont effectués en gélose préparée, selon une technique empruntée à GRABAR et BURTIN, à

partir d'agarose pur et Tampon véronal pH 8,2, décrite par ailleurs.

— La déviation du complément est réalisée selon la méthode classique de KOLMER. Le temps de fixation du complément est d'une heure au bain-marie à + 37°. Après addition de la suspension d'hématies sensibilisées, la lecture est faite une première fois après 1 heure au bain-marie à + 37°, une deuxième fois après une nuit à + 4°.

— Les tests de séro-neutralisation sont effectués selon la méthode « à sérum constant » (dilution 1/10 en présence de suspensions de virus de titre variant de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ).

— Les sérums de lapin, recueillis entre le 20<sup>e</sup> et le 60<sup>e</sup> jour suivant la première inoculation de virus vivant, sont précipitants (++) à (+++); ils sont également neutralisants (index compris entre 2 et 3,5); il devient le complément (1/8 à 1/64).

— Le sérum de génisse est, également, prélevé entre le 20<sup>e</sup> et le 60<sup>e</sup> jour suivant la première inoculation : il est précipitant (+); il fixe le complément (1/16) en présence des antigènes définis ci-dessus et neutralise le virus (index 2). Neuf mois après la première inoculation, il est encore neutralisant (même titre), mais n'est plus précipitant.

— Des cinq sérums de taureaux, quatre sont positifs en immuno-diffusion (++, +, O, +, ++); quatre sont positifs en déviation du complément (dans le même ordre : 1/16, 1/8, douteux, 1/8, 1/16). Les cinq sont positifs en séro-neutralisation, à des titres supérieurs à 1/500, en présence de 100 unités infectantes du virus I. P. V. (souche de l'American type culture collection).

— Des 120 paires de sérums de taureaux, les uns atteints ou ayant été atteints de balanoposthites avec suspicion d'infection par le virus I. B. R./I. P. V., les autres ayant pu être infectés au contact des précédents, 42 (35 p. 100) sont positives en immuno-diffusion pour au moins l'un des deux échantillons. On observe peu de différence entre les deux séries : 31 sérums sont positifs dans la première série, 35 dans la deuxième (25 p. 100 dans la série « précoces », 28 p. 100 dans la série « tardifs »). Pour 23 paires, les deux échantillons sont positifs. Pour 12 paires, le premier est négatif, le deuxième positif; pour 8 paires, le premier est positif, le deuxième négatif. Pour 16 paires de sérums, pour lesquels un échantillon au moins est non seulement positif en

immuno-diffusion mais aussi en déviation du complément, les deux échantillons sont positifs en séro-neutralisation. Les sérums positifs en séro-neutralisation ne sont pas nécessairement positifs dans l'une des deux autres réactions (fixation du complément ou immuno-diffusion) ou dans les deux.

— En ce qui concerne les 33 paires de sérums de veaux, pour lesquels l'intervalle séparant les deux saignées, précoce et tardive, est de 26 jours, le pourcentage des résultats positifs en immuno-diffusion passe, d'une série à la série appariée de 0 à 15. Ces sérums n'ont pas encore été testés dans les deux autres méthodes.

Le fait d'immuniser le lapin avec un antigène non purifié, mais préparé sur cellules de rein d'agneau, permet d'utiliser le sérum de lapin, en présence d'un antigène préparé par culture sur rein de veau, en réduisant l'importance des réactions non spécifiques. Testés en parallèle, en immuno-diffusion, en présence du même antigène, le sérum de génisse et le sérum de lapin montrent des arcs de précipitation en continuité, paraissant donc bien spécifiques d'une réaction antigène/anticorps proprement virale.

Pour les sérums de bovins provenant des deux origines définies plus haut (120 taureaux et 33 veaux), lorsque les réactions d'immuno-diffusion sont positives, les arcs de précipitation sont en continuité avec ceux des réactions fournies par les sérums de référence. Les réactions ont, en général, la même intensité ; pour ceux qui ont été mesurés, les titres, en déviation du complément, s'échelonnent entre 1/4 et 1/64 ; en séro-neutralisation, les titres sont comparables à ceux des sérums de référence.

Comme pour le lapin d'expérience, les résultats relatifs aux sérums bovins, positifs dans deux ou trois des méthodes ne montrent aucune corrélation entre séro-neutralisation, d'une part, immuno-diffusion et déviation du complément d'autre part. Plusieurs sérums, positifs en séro-neutralisation, ne donnent aucune réaction en immuno-diffusion. Aucune observation, relative à l'une quelconque des 153 paires de sérums n'infirme l'hypothèse, suggérée par les résultats obtenus expérimentalement chez le lapin, selon laquelle les titres, en séro-neutralisation, peuvent rester constants et élevés, chez des sujets guéris, durant des périodes beaucoup plus longues que celle où les résultats en immuno-diffusion sont positifs : le pourcentage des résultats positifs en I. D., pour un lot de sérums donnés, ne peut donc qu'être plus faible que celui des résultats positifs en S. N. sans

que l'on puisse imputer cette différence à une moindre sensibilité de l'immuno-diffusion par rapport à la séro-neutralisation. La différence de signification des résultats de l'une et l'autre méthode, si elle est, chez le bovin, la même que chez le lapin, ne permet pas de confronter la sensibilité relative de l'une ou l'autre des méthodes.

Ces premiers résultats paraissent, par ailleurs, permettre de proposer l'immuno-diffusion comme une méthode de contrôle sérologique intéressante à un double point de vue : diagnostic étiologique expérimental, enquête épidémiologique. La probabilité pour qu'un résultat positif en immuno-diffusion contre l'antigène concentré I. B. R./I. P. V. signe, à la fois, l'existence de l'infection et son caractère récent est forte : le choix de cette méthode comme première approche dans le dépistage des infections à virus I. B. R., les méthodes quantitatives telles que déviation du complément et séro-neutralisation, plus « lourdes », pouvant être par la suite appliquées dès que l'on observe dans la première méthode des résultats positifs, nous semble logique.

*(Laboratoire de recherches (I.N.R.A.)  
de la Chaire de Pathologie du Bétail.  
Ecole vétérinaire d'Alfort.)*

### RÉSUMÉ

D'exécution aisée, rapide, applicable au contrôle de sérums nombreux, la méthode d'immuno-diffusion en gélose apporte, dans le diagnostic expérimental et l'enquête épidémiologique d'infections à *Herpesvirus bovis* chez les Bovins (rhinotrachéite infectieuse, balanoposthites de taureaux) des résultats dont la signification (preuve de l'infection et de son caractère récent) est différente de ceux de la séro-neutralisation.

### DISCUSSION

M. LAGNEAU. — *Pseudomonas* est fréquemment rencontré dans l'appareil génital de taureaux ne présentant aucun signe clinique et dont la fécondité est normale. Il ne faut donc pas trop s'étonner du fait qu'il a été mis en évidence à plusieurs reprises au cours de cette expérimentation.

*Réponse.* — Des 123 écouvillonnages de fourreau parvenus au Laboratoire en même temps que les 123 paires de sérums, *Pseudomonas* a été isolé 107 fois (87 p. 100). Ce chiffre confirme peut-être votre observation ; il nous a paru, cependant, peu probable qu'un tel foisonnement (encore les chiffres ci-dessus ne concernent-ils que les souches chromogènes cultivant, le plus souvent en masse, dès le premier ensemencement) soit sans rapport avec la fréquence, la gravité pour nombre d'entre elles, des balano-posthites observées. Si nous avons attribué à *Herpesvirus bovis* un rôle primitif dans ces balano-posthites, nous avons admis, à l'époque, que leur caractère de gravité était, fort probablement, le fait de l'infection bactérienne secondaire, dans laquelle *Pseudomonas* prédominait.

M. RENAULT. — L'utilisation de l'immunodiffusion permet également en pathologie aviaire de préciser la différence entre les anticorps dus à la vaccination et ceux dus à une réinfection, comme dans le cas de la bronchite infectieuse et de la maladie de Newcastle. En effet les anticorps dans l'immunodiffusion correspondent à un passage récent de virus depuis quelques semaines, après une vaccination récente ou après une réinfection, et disparaissent par la suite.

M. PERREAU. — L'immunologie de la peste équine offre un bon exemple de la nécessité du choix des tests sérologiques selon ce qu'on veut en tirer.

Le test de séro-neutralisation n'indique qu'un niveau d'immunité, sans qu'on puisse fixer l'époque de l'infection ou même de la vaccination ; au contraire le test de fixation du complément, lorsqu'il est positif, signe une infection récente, d'où son intérêt dans les enquêtes épidémiologiques.

---