

Diagnostic de la rage

Observations faites au cours de l'examen de 1.000 prélèvements suspects

par A. LUCAS, R. CARNERO, M. PICARD,
C. COSTES et M. LAHELLEC

Depuis le 1^{er} août 1968, le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort a été amené à mettre en place un ensemble de techniques aboutissant à une méthode de détection formelle du virus rabique, travail dont les buts sont la surveillance au jour le jour de l'évolution rabique sur le territoire national et l'étude des caractéristiques de cette rage « sauvage », maladie nouvelle en Europe Occidentale.

L'Institut Pasteur de Paris qui avait jusqu'alors toujours assumé la surveillance de la maladie en France avec des finalités thérapeutiques pour les humains, s'est donc vu aidé à la suite d'un accord avec les Services Vétérinaires du Ministère de l'Agriculture par un certain nombre de Laboratoires Vétérinaires, dont le nôtre.

Suivant les idées reprises par le Professeur LÉPINE dans son traité des « Techniques de Laboratoire en Virologie humaine », on prit en considération deux éventualités « conditionnées par l'urgence du diagnostic, selon qu'il y a ou non des mordus pour qui se pose la question du traitement antirabique ».

1^o Il y a des personnes mordues :

« Le diagnostic dont dépend la conduite à tenir est urgent. On ne peut attendre le résultat des inoculations, plusieurs cas sont alors à considérer. »

Cette partie du travail est demeurée à la charge de l'Institut Pasteur, qui, traditionnellement, l'a toujours remplie.

2^o « Il n'y a pas de personnes mordues, ou celles-ci sont déjà en traitement. »

Le diagnostic n'est plus un diagnostic d'urgence, il consiste à identifier un virus.

Cet aspect du problème a été confié à différents laboratoires Vétérinaires et entre autre au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort qui a commencé à remplir cette mission à dater du 1^{er} août 1968.

Le nombre de prélèvements examinés à la date du 27 novembre 1969 s'élève à 1.000, et nous avons pensé qu'il pouvait être intéressant de faire une récapitulation des observations faites à l'occasion de ce travail jusqu'à cette date.

Les techniques utilisées pour établir les diagnostics ont été, dès le mois d'Août 1968, celles de :

- l'immunofluorescence,
- et de l'inoculation aux souris.

Les raisons de ce premier choix ont été de réunir la technique la plus précoce, l'immunofluorescence, et la plus fidèle dans ses résultats, l'inoculation aux souris.

Par la suite, et suivant en cela les recommandations du Comité d'Experts de la Rage de l'O. M. S., nous leur avons ajouté, d'abord les épreuves cytologiques, pour la recherche des corps de Négri dans le matériel suspect, puis la méthode de Sellers a été complétée, un peu plus tard, par des examens sur coupes histologiques.

Tout prélèvement qui arrive au Laboratoire est donc soumis à l'ensemble des tests suivants :

- d'abord immunofluorescence et coloration de Sellers sur le prélèvement,
- puis examen histologique et inoculation aux souris.

Le virus éventuel qui peut se multiplier dans le cerveau de la souris est dépisté et identifié par l'épreuve d'immunofluorescence sur le cerveau de ces souris.

Pour cela, au cours de la période d'observation des animaux inoculés, on prélève des souris de façon systématique à des périodes données en vue de leur examen par immunofluorescence.

Le diagnostic posé par le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, de caractère éminemment épidémiologique, est basé sur la concordance du résultat des techniques apportant des éléments de certitude.

Les diverses formes de comportement d'un prélèvement positif peuvent être résumées comme suit :

a) *Prélèvement franchement positif* : c'est-à-dire positif net à l'immunofluorescence, technique formelle par sa spécificité de réaction antigène-anticorps, et qui nous apporte un deuxième élément de certitude par la visualisation des corps de Négri, montrant leur structure particulière et en quantité suffisante pour émettre un diagnostic formel.

Dans la plupart des cas, cette observation est confirmée par la mise en évidence de corps de Négri par la coloration de Sellers.

b) *Observation des coupes histologiques* : elle entraîne un diagnostic de certitude quand la localisation intra-cellulaire des corps de Négri et leur structure sont nettes dans la préparation.

c) *Inoculation aux souris* : elle conduit à un diagnostic de certitude par la mise en évidence des corps de Négri identifiés par la technique d'immunofluorescence, et indépendamment de la symptomatologie que peuvent présenter les souris.

RÉPARTITION DANS LE TEMPS ET RÉSULTATS OBTENUS

Le rythme d'arrivée et les résultats obtenus sur les 1.000 prélèvements parvenus à notre Laboratoire, en 16 mois environ, sont résumés dans le tableau n° 1.

Sur ce nombre et pour différentes raisons, 40 prélèvements ne nous ont pas permis d'établir un diagnostic formel. Sur les 960 autres les résultats se répartissent en 247 cas positifs et en 713 cas négatifs.

Le matériel et les méthodes utilisés ont fait l'objet d'une publication antérieure (1).

ESPÈCES ANIMALES AYANT FAIT L'OBJET D'UNE SUSPICION DE RAGE

Pour ce qui est des espèces animales envoyées au Laboratoire en vue du diagnostic de rage, le tableau n° 2 résume leur distribution.

On peut constater que le renard, principal agent épizootiologique a motivé le plus grand nombre d'envois. Il est suivi par le chien, toutefois d'assez loin, en raison peut-être du souvenir d'autres épizooties, associé à la difficulté pour le praticien d'établir un diagnostic différentiel avec d'autres maladies canines.

(1) « La Rage ». Informations Techniques des Directions des Services Vétérinaires. 1969, 25-26, 37-45.

TABLEAU 1

<i>Année 1968</i>	Nombre de prélèvements reçus	Nombre de prélèvements positifs	Nombre de prélèvements négatifs	Impossibilité d'établir un diagnostic
Août	17	0	10	7
Septembre . . .	26	4	21	1
Octobre	53	13	37	3
Novembre . . .	41	8	33	0
Décembre . . .	69	9	59	1
<i>Année 1969</i>				
Janvier	78	6	69	3
Février	55	15	40	0
Mars	79	15	60	2 EVA 2*
Avril	93	12	76	2 EVA 3*
Mai	65	8	55	2
Juin	41	12	27	2
Juillet	59	15	43	1
Août	57	15	35	7
Septembre . . .	81	27	54	0
Octobre	102	43	57	2
Novembre, 27	84	45	37	2
<p>* EVA 2, EVA 3 : Il s'agit de prélèvements reçus et enregistrés par le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort et qui, à la demande de nos collègues spécialisés de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (Chaire des Maladies Contagieuses) leur ont été confiés en vue du diagnostic.</p>				

Les animaux sauvages autres que le renard n'atteignent pas un chiffre très élevé. L'espèce animale n'a eu aucune influence sur les techniques appliquées. Il faut signaler cependant que la coloration de Sellers sur des calques préparés à partir de cerveaux de bovidés est plus difficile à interpréter que celle appliquée à d'autres espèces animales. Cela est dû au faible nombre des grandes cellules pyramidales qui se fixent sur la lame.

TABLEAU 2

	Nombre d'animaux envoyés	Nombre d'animaux diagnostiqués positifs
Renard	570	163
Bovin	120	63
Chien	166	7
Chat	42	2
Chevreuil	43	5
Blaireau	12	2
Mouton	13	1
Chèvre	2	0
Lapin	2	0
Cheval	4	2
Ane	1	1
Porc	1	0
Rat	2	0
Lièvre	7	0
Chat sauvage	2	0
Rat musqué	2	0
Fouine	5	0
Lerot	1	0
Martre	3	0
Putois	2	1

LES DÉLAIS DU DIAGNOSTIC

Malgré le caractère spécifiquement épizootologique de notre diagnostic qui nous amène à établir des diagnostics de certitude, le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort a le plus grand souci d'alerter les autorités sanitaires le plus rapidement possible sur la présence du virus rabique dans une région, afin de leur permettre de mettre en place les mesures adéquates.

Dans le tableau n° 3 sont résumés, de façon globale et sans tenir

TABLEAU 3

	Nombre de cas	Pourcentage
Total des cas positifs diagnostiqués au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort sur les 1.000 premiers prélèvements reçus	247	
Nombre de cas positifs, à partir du prélèvement lui-même, diagnostiqués dans les 48 heures qui ont suivi sa réception au Laboratoire.....	221	89,5
Nombre de cas positifs diagnostiqués pendant la semaine suivant leur arrivée au Laboratoire, 5 à 8 jours.....	6	2,4
Nombre de cas positifs diagnostiqués pendant la deuxième semaine suivant leur arrivée au Laboratoire, 9 à 14 jours.....	8	3,2
Nombre de cas positifs diagnostiqués pendant la troisième semaine suivant leur arrivée au Laboratoire, 14 à 21 jours.....	10	4,1
Nombre de cas qui ont demandé plus de 21 jours pour établir leur diagnostic.....	2	0,8

compte de l'état de conservation des prélèvements, les délais dans lesquels les diagnostics positifs ont pu être établis.

Il se dégage de ce tableau que la plupart des cas positifs sont dépistés dans les heures qui suivent leur arrivée au Laboratoire. Ce délai s'allonge pour un nombre réduit de prélèvements soit parce que l'immunofluorescence n'a pu être appliquée dans des conditions normales, soit parce que la quantité d'antigène présente dans le cerveau était si faible, qu'elle n'a pu être détectée. Ces échantillons sont rattrapés par les inoculations aux souris, et éventuellement par l'analyse anatomo-pathologique. Soulignons toutefois, qu'en liaison apparente avec la pauvreté du cerveau originel en matériel viral, dans la plupart des cas la certitude n'est acquise qu'entre les 14^e et 21^e jour, et que deux échantillons positifs ont nécessité un délai supérieur à 21 jours. La première inoculation aux souris ayant donné des résultats douteux, il a fallu parfois avoir recours à d'autres inoculations.

LA PUTRÉFACTION ET LES POSSIBILITÉS DU DIAGNOSTIC

Un point particulièrement important dans le diagnostic de la

rage est l'état de conservation du prélèvement à sa réception au Laboratoire.

162 prélèvements nous sont parvenus dans un état de putréfaction avancée dû à des causes diverses : longues périodes d'acheminement, blessures ouvertes du crâne, animaux trouvés morts, etc...

Ces prélèvements sont soumis à deux types d'analyses :

1° Immunofluorescence sur les cellules recueillies dans le sédiment de centrifugation du broyat,

2° Inoculation de ce broyat aux souris par voie intracérébrale.

Les résultats sont regroupés dans le tableau n° 4.

TABLEAU 4

Nombre de prélèvements arrivés en putréfaction et pour lesquels aucun examen histologique n'est possible.	162
Nombre de prélèvements toxiques pour les souris.	23
Nombre de prélèvements diagnostiqués négatifs par inoculation aux souris et immunofluorescence.	102
Nombre de prélèvements négatifs à l'immunofluorescence et positifs par inoculation aux souris.	4
Nombre de prélèvements diagnostiqués positifs par immunofluorescence, directement sur les broyats.	33
Total des cas positifs.	37

Il se dégage de ce tableau que le matériel en putréfaction n'est toxique pour les souris, par voie intracérébrale, que dans un nombre réduit de cas et que le dépistage des corps de Négri par immunofluorescence à partir du sédiment cellulaire est relativement aisé.

En effet, dans 33 cas le diagnostic a pu être établi de façon formelle par cette technique et, dans 4 cas, le virus a été isolé par inoculation à la souris.

CONSIDÉRATIONS SUR LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES UTILISÉES

1° *Les Techniques Cytologiques* ont été utilisées à partir du 576^e prélèvement, donc sur les 424 derniers ; 157 d'entre eux provenaient d'animaux atteints de rage.

La coloration de Sellers et l'histopathologie ont pu être appliquées chacune respectivement dans 322 cas, qui ne sont d'ailleurs pas exac-

tement les mêmes, soit, pour l'une comme pour l'autre méthode, sur environ 75 p. 100 du matériel examiné pendant cette période.

Les résultats obtenus par ces deux techniques sur les 157 cas positifs ont été les suivants :

Sellers

103 positifs, soit	65,6 p. 100
14 négatifs, soit	8,9 p. 100
34 cas impossibles à diagnostiquer.....	21,6 p. 100
6 cas douteux, soit	3,9 p. 100

Histopathologie

115 positifs, soit	73,2 p. 100
9 négatifs, soit	5,7 p. 100
31 cas impossibles à diagnostiquer	19,7 p. 100
2 cas douteux, soit	1,4 p. 100

2° *L'immunofluorescence* a été utilisée dès le début de ce travail de diagnostic.

Sur les 1.000 premiers prélèvements dont nous faisons ici l'étude, l'immunofluorescence n'a pu être appliquée qu'à 960 échantillons.

Ses résultats dans les 247 cas positifs diagnostiqués sont les suivants :

221 cas positifs, soit.....	89,5 p. 100
12 cas négatifs, soit	4,8 p. 100
5 cas impossibles, soit	2,1 p. 100
9 cas douteux, soit	3,6 p. 100

Les pourcentages sont éloquentes par eux-mêmes, mais il nous semble cependant nécessaire d'y ajouter quelques commentaires.

Les cas positifs signalés (89,5 p. 100) ont été à l'origine d'un diagnostic formel de rage dans un délai maximum de 48 heures.

Les cas négatifs à l'immunofluorescence ne conduisent pas à un diagnostic formellement négatif. En effet, l'absence de corps de Négri par cette technique n'exclut pas la présence du virus rabique.

Les cas douteux méritent une mention spéciale parce qu'ils peuvent fonder un diagnostic de suspicion. Leur nombre se chiffre à 26 pour l'ensemble des 1.000 prélèvements, et, parmi eux, 9 seulement se sont révélés positifs par les autres épreuves.

Ce diagnostic de suspicion revêt une particulière importance quand il y a lieu d'envisager une suite thérapeutique, ce qui, en principe, n'est jamais notre cas, mais aussi lorsque le prélèvement provient d'une région indemne de rage.

Cette suspicion doit être considérée sous un double aspect :

a) Tout prélèvement qui provient d'une région contaminée doit être considéré comme provenant d'un animal suspect de rage, quel que soit le résultat des premiers examens.

b) Devant une immunofluorescence douteuse, un diagnostic de très forte suspicion pourrait être posé. Soulignons que cette décision atteindrait 2,6 p. 100 des prélèvements reçus, chiffre relativement bas. Par contre, elle comporterait environ 65 p. 100 d'erreurs par excès, c'est-à-dire de cas douteux qui s'avèreraient négatifs par la suite.

3° *L'inoculation intracérébrale à la souris* demeure l'épreuve la plus sûre pour la détection du virus rabique.

D'une façon générale, les symptômes se déclenchent chez les souris entre le 12^e et le 14^e jour qui suivent l'inoculation et la mort survient généralement 24 heures plus tard.

Les limites entre lesquelles ces symptômes sont apparus dans notre utilisation quotidienne de ce procédé sont de 7 et 21 jours.

Il faut signaler cependant que dans 6 cas, les symptômes cliniques ne sont apparus qu'après le délai d'observation de 21 jours (Sur ces 6 cas, 4 se sont avérés positifs à l'immunofluorescence sur les prélèvements d'origine).

Le déroulement normal du diagnostic sur les souris inoculées est le suivant :

— Premier temps : mise en évidence de corps de Négri dans le cerveau de la souris par immunofluorescence.

— Deuxième temps : dans un délai qui varie de 3 à 5 jours après le premier temps, apparition des symptômes cliniques.

— Troisième temps : 24 heures après cette apparition, mort de l'animal.

Toutefois, ce déroulement normal est souvent perturbé. C'est ainsi qu'il arrive parfois que les symptômes n'apparaissent qu'après un délai relativement long, sans qu'il y ait de relation apparente avec la quantité d'antigène observée par l'immunofluorescence ou l'histopathologie dans les prélèvements d'origine.

Il nous arrive aussi parfois de trouver une survivance de une ou de deux souris dans les lots de dix habituellement inoculées.

Une étude est en cours pour préciser dans quelles proportions nous nous trouvons en présence de ce fait et quelles en sont les causes. Sans doute est-il lié à des phénomènes d'auto-stérilisation.

De plus, à deux reprises nous avons constaté une fluorescence douteuse 21 jours après l'inoculation, sur des souris en bon état apparent de santé. Des épreuves complémentaires ont confirmé la présence du virus rabique dans le prélèvement.

Dans deux cas, enfin, les souris inoculées avec un matériel positif à l'immunofluorescence et à l'histopathologie sont mortes dans un délai inférieur à cinq jours, en raison sans doute de propriétés toxiques du broyat. Le diagnostic dans ces deux cas a été ainsi privé de sa confirmation systématique par inoculation.

En résumé, le comportement des lots de dix souris inoculées avec un matériel positif peut être schématisé de la façon suivante, après 21 jours d'observation :

- Mortalité à 100 p. 100 avec immunofluorescence positive ;
- Mortalité d'importance variable avec immunofluorescence positive associée à une survivance en état de santé apparent mais donnant des immunofluorescences positives ou au moins douteuses ;
- Absence de mortalité et de symptômes cliniques, mais immunofluorescence douteuse ou positive.

Le comportement individuel des souris n'est pas en cause, puisque les souris d'un même lot se comportent de façon normale en face d'autres broyats positifs ou négatifs.

A notre avis, ce sont des caractéristiques propres aux prélèvements qui jouent le rôle essentiel dans la genèse de ces anomalies.

En effet, ces cas asymptomatiques avec fluorescence douteuse ont été étudiés de deux façons :

1° Par inoculation du broyat de cerveau des souris douteuses au 21^e jour à un nouveau lot de souris.

Dans ce deuxième lot, la maladie se reproduit de façon normale :

2° Pour contrôle, une partie du broyat de tous nos prélèvements originels est conservée, sans centrifugation, à — 20° C. Ceci nous permet, dans les cas douteux, de récupérer les sédiments cellulaires pour les examiner à nouveau par immunofluorescence et le surnageant pour procéder à de nouvelles inoculations à la souris. Nous avons pu constater ainsi que cette deuxième inoculation s'est révélée positive dans les deux premières semaines et s'accompagne d'un comportement normal des souris qui, cette fois, font des signes cliniques. Deux raisons peuvent expliquer ces faits :

- libération du virus pendant la décongélation,
- perte ou inhibition de substances toxiques pendant la congélation.

Ces observations se sont présentées surtout lorsque les broyats

ont été obtenus à partir de prélèvements en mauvais état de conservation.

Notre Laboratoire a commencé une nouvelle série d'études de ces broyats pour établir la présence et l'instabilité de ces facteurs dont nous suspectons la présence.

Enfin, une expérimentation réduite a été effectuée sur un échantillonnage de cas négatifs provenant des zones contaminées. Ces prélèvements se sont toujours révélés négatifs à la deuxième inoculation pratiquée dans les conditions décrites. Des travaux se poursuivent dans ce sens.

L'ensemble des observations ci-dessus rapportées nous oblige, tout en considérant l'inoculation à la souris comme la meilleure méthode de détection du virus rabique, à l'employer toujours et de façon systématique en liaison avec l'immunofluorescence et cela tout spécialement pendant les derniers jours d'observation des souris inoculées, même si celles-ci ne manifestent aucun symptôme de maladie.

De même, nous avons été amenés à prolonger la période de leur observation jusqu'à 28 jours en raison des cas positifs que nous avons rencontrés passés les 21 jours fixés jusqu'alors comme limite minimum à l'observation.

En résumé, l'expérience acquise au cours de l'étude de ces 1.000 premiers prélèvements nous incite à souligner les points suivants :

1° Nous confirmons la grande valeur et les avantages de l'immunofluorescence.

L'aspect morphologique du corps de Négri associé à la spécificité de la coloration permet un diagnostic rapide et de certitude.

2° La coloration de Sellers entre les mains d'un personnel expérimenté représente une méthode valable d'orientation d'un diagnostic et de confirmation éventuelle du résultat du premier procédé.

Dans le cadre de notre Laboratoire, l'emploi simultané de ces deux techniques nous a permis de poser les diagnostics dans 90 p. 100 des cas positifs, durant les 48 premières heures qui suivent l'arrivée des prélèvements au Laboratoire.

3° L'histopathologie classique qui fut longtemps à la base du diagnostic de la rage cède du terrain en faveur des méthodes précédentes. Son emploi demeure, cependant, toujours recommandable en raison des éléments de certitude qu'elle peut apporter.

4° L'inoculation à la souris et leur observation systématique pendant une période recommandable de 28 jours est, à notre avis, la plus sûre des méthodes qui puisse être employée.

Les inconvénients de chaque technique prennent leur origine, dans la plupart des cas, dans le mauvais état de conservation du prélèvement à sa réception. Citons, notamment, l'impuissance de la cytologie en face d'un grand nombre de ces cas.

L'immunofluorescence a une plus large application, puisque l'examen du broyat permet un grand nombre de diagnostics.

Toutefois, nous pensons que l'emploi de toutes les techniques décrites est indispensable et s'impose sur les échantillons négatifs aux premières épreuves.

Ainsi, l'examen épizootologique que le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort a entrepris fait usage des techniques suivantes :

Sur le prélèvement :

— Immunofluorescence avec visualisation des corps de Négri	+	} diagnostic de certitude
— Sellers	+ ou 0	
— Histopathologie	+ →	diagnostic de certitude
— Inoculation aux souris plus	+	} diagnostic de certitude
— Immunofluorescence		

Il est bien entendu que nous continuons à employer l'ensemble des techniques dans tous les cas, qu'ils soient positifs ou négatifs, afin d'étudier l'ensemble des problèmes que pose ce diagnostic et pouvoir faire varier, le cas échéant, leur application et l'appréciation de leur valeur en fonction de cette expérience.

CONCLUSIONS

De tout ce qui vient d'être exposé, il se dégage que pour poser un diagnostic épidémiologique de la rage, il est nécessaire :

- a) de combiner l'emploi de plusieurs techniques d'examen,
- b) d'observer les souris inoculées durant un délai supérieur à 21 jours, et qui devrait être de 28 jours.

Cette période d'observation doit se terminer par un examen en immunofluorescence portant, au moins, sur un échantillonnage des souris survivantes, même si elles sont en bon état de santé.