

# **Isolement d'un virus dans une infection respiratoire de l'Agneau**

par MM. A. GIAUFFRET, P. RUSSO \*

note présentée par M. DHENNIN

---

Les infections néonatales entraînent des pertes économiques, liées à une baisse de rendement et à la mortalité d'un certain nombre de sujets. Des enzooties d'étable ou de troupeau persistent souvent pendant de longues périodes avec un taux de morbidité très élevé. La mort des animaux est le plus souvent due à l'action pathogène de diverses bactéries, mais la possibilité d'infections virales à l'origine de certaines enzooties a souvent été évoquée.

Parmi les virus qui présentent un tropisme pour l'appareil respiratoire, les Myxovirus parainfluenza ont une importance particulière chez les ruminants, aussi bien chez l'adulte que chez les jeunes animaux. Leur isolement a également été signalé à partir d'avortons de brebis (4-5).

En France, l'isolement d'un Myxovirus parainfluenza 3 a été obtenu à partir des lésions de pneumonie d'un veau (1) et la présence d'anticorps vis-à-vis du même virus a été démontrée chez les ovins (2). Le présent travail signale l'isolement d'une souche de virus, que ses caractères rapprochent des paramyxovirus, à partir des lésions pulmonaires d'un agneau, provenant d'un effectif où sévissait une enzootie néonatale à localisations respiratoires.

## **ETUDE CLINIQUE, EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE**

Les prélèvements étudiés provenaient d'un petit effectif où sévissait une enzootie de troupeau atteignant uniquement les

---

(\*) Laboratoire Régional de Recherches Vétérinaires, 63, avenue des Arènes, 06 - Nice, avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> Ch. ETASSE et de M. R. GARIN.

jeunes. Dans l'ensemble, l'état général des agneaux était défec-tueux et on notait pour quelques-uns d'entre eux une entérite liée à une coccidiose importante. Des signes d'infection respira-toire, de gravité variable ont été constatés chez la plupart des animaux, entraînant plusieurs cas de mortalité, après une évo-lution de 4 ou 5 jours.

Les recherches virologiques ont été entreprises à partir du cadavre d'un agneau de un mois environ, qui présentait à l'autopsie des lésions importantes d'hépatisation pulmonaire.

L'examen bactériologique a permis d'isoler *Escherichia coli* à partir des lésions de pneumonie et de différents viscères. Après traitement anticoccidien et traitement antibiotique, l'enzootie a persisté pendant plusieurs semaines et d'autres cas de mortalité ont été notés.

#### CULTURES CELLULAIRES

L'isolement du virus et la plupart des essais ont été réalisés sur une souche cellulaire obtenue au laboratoire par trypsi-nation des masses musculaires d'un fœtus de mouton (souche M. E. M. 1 entre la 17<sup>e</sup> et la 35<sup>e</sup> explantation). Cette souche est cultivée sur milieu essentiel minimum de Eagle avec sels de Hanks, enrichi en glucose (4,5 g/l) en bouillon tryptose phos-phate (2,6 g/l), en vitamines (3 x) \* et additionné de 10 p. 100 de sérum de veau. Les explantations ont été réalisées tous les 3 à 5 jours, en dissociant la couche monocellulaire avec une prépa-ration contenant de la trypsine (0,25 p. 100) et du versène (0,025 p. 100) dans la solution de Hanks sans sels de calcium ni de magnésium.

Une étude du caryotype de la souche utilisée a été faite en 28<sup>e</sup> explantation. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Nombre de chromosomes	52	53	2 n = 54	55	56	107/108
Nombre de mitoses	7	9	58	2	1	2

Pour 79 mitoses étudiées la proportion des formules diploïdes (6) atteint 73,4 p. 100 (fig. 1) et le pourcentage de

(\*) Milieu G. R. M. Eurobio.

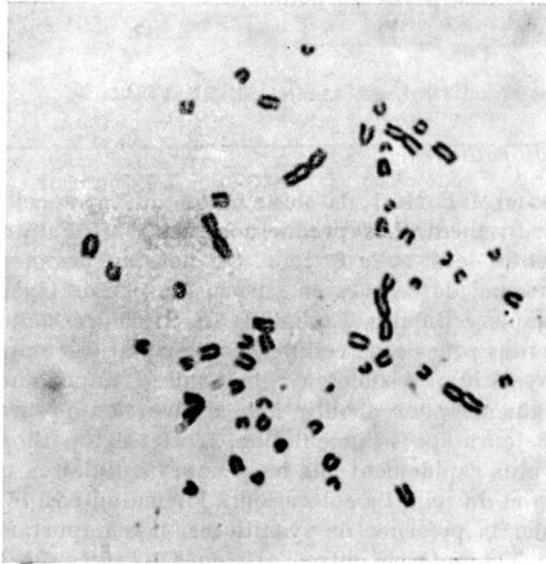


FIG. 1. — Mitose diploïde (souche M. E. M. 1) :  
étalement de chromosomes et regroupement par paires.

tétraploïdies est faible (2,5 p. 100). Cette souche peut être considérée comme diploïde à ce stade de son évolution. Elle est conservée à congélation dans l'azote liquide.

La culture du virus a également été obtenue sur trois autres souches cellulaires de mouton provenant de muscle, du rein et du poumon, au-delà de la 15<sup>e</sup> explantation.

#### ISOLEMENT DU VIRUS

Les cultures en couche monocellulaire, en milieu de survie comportant 0,5 p. 100 de sérum de veau, ont été inoculées au 1/10 avec des extraits préparés à partir des différents prélèvements. En l'absence d'effets cytopathogènes visibles à l'état frais, trois passages successifs ont été faits après cinq jours de culture. Un effet cytopathogène tardif a été obtenu en 2<sup>e</sup> passage pour le prélèvement pulmonaire et en 3<sup>e</sup> passage pour le foie. L'examen virologique des matières fécales a été négatif. Les souches isolées ont été passées régulièrement sur souche M. E. M. 1. Un stock de virus constitué en 3<sup>e</sup> passage est conservé dans l'azote liquide. Il a été utilisé pour l'étude du virus (souche V. 1673-71 isolée à partir du poumon).

#### ETUDE PRÉLIMINAIRE DU VIRUS

##### 1) *Effet cytopathogène.*

Sur souche M. E. M. 1, la destruction du tapis cellulaire se produit tardivement. Les premiers signes sont habituellement constatés entre le 4<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour. On note en premier lieu un nombre anormal de cellules en suspension et une légère réfringence du tapis cellulaire. En moins de 24 heures apparaissent alors de petites zones sans cellules, comportant à leur périphérie quelques syncytiums visibles à l'état frais. L'importance de ces lésions augmente pour aboutir à la destruction progressive du tapis 5 à 8 jours après l'inoculation. L'effet cytopathogène s'est manifesté plus rapidement sur les souches cellulaires provenant du poumon et du rein. La coloration à l'hémalun-éosine a permis de confirmer la présence de syncytiums, très importants en fin d'évolution. On note en outre l'existence très régulière d'inclusions cytoplasmiques éosinophiles, multiples, de forme irrégulière et d'aspect très caractéristique (fig. 2).

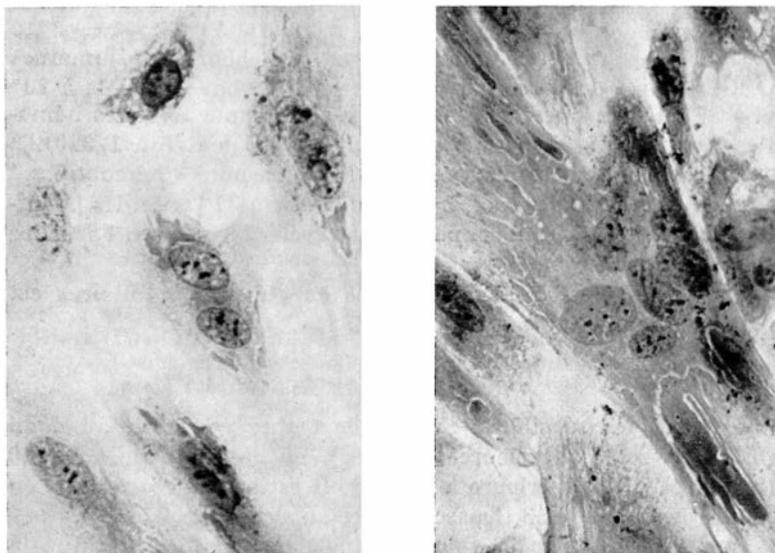


FIG. 2. — Lésions cellulaires *in vitro* : syncytiums et inclusions cytoplasmiques caractéristiques (hémalun éosine).

TABLEAU I. — Cinétique de l'action du virus en cultures cellulaires

Nombre de jours	Inclusions (p. 100 des cellules +)	Syncytiums	Hémadsorption (p. 100 du tapis Ha +)	E. C. P. (p. 100 du tapis détruit)
1	0	0	30 p. 100	0
2	7	0	70 p. 100	0
3	70	rare 2 ou 3 noyaux	95 p. 100	+ —
4	80	plus nombreux 5 à 10 noyaux	95 p. 100	40 p. 100
5	100	nombreux 15 à 20 noyaux	100 p. 100	60 p. 100
6	/	/	/	100 p. 100

## 2) *Héماغglutination, héماغsorption.*

Des essais ont été entrepris avec des hématies humaines O Rh +, avec des hématies de poulet et de cobaye, à + 4° à 20° et à 37°. La plus grande sensibilité a été obtenue avec les hématies de cobaye à 37° (titres héماغglutinants de 1/8 à 1/320).

Au cours de ces essais, nous n'avions pas noté d'hémolyse.

L'utilisation de l'héماغsorption, obtenue à 37° avec des hématies de cobaye à 1 p. 1.000, permet de révéler le virus en l'absence d'effet cytopathogène.

La cinétique de l'action du virus en cultures cellulaires est résumée dans le tableau I.

## 3) *Action des agents physicochimiques.*

Le virus est sensible à l'action de l'éther éthylique au demi (baisse de titre supérieure à 2,5 log), au chloroforme au 1/20 (baisse de titre supérieure à 3,5 log). Il est également détruit en quatre heures à pH 3 (baisse de titre supérieure à 3,5 log).

Une exposition de 30 minutes à 56° ou à 50° a entraîné la destruction du virus (baisse de titre supérieure à 3,5 log dans les deux cas).

## DISCUSSION-CONCLUSIONS

Ce travail nous a permis d'isoler une souche virale à partir de différents organes d'un agneau provenant d'un effectif où sévissait une enzootie d'infections respiratoires. Les caractères de la souche isolée permettent de la rapprocher des Myxovirus (7) et plus particulièrement du groupe des paramyxovirus, en raison de l'existence d'inclusions éosinophiles cytoplasmiques. Cette caractérisation est confirmée par les premiers résultats de l'étude en microscopie électronique. La présence du virus dans les lésions de pneumonie et dans le foie du même animal indique une infection généralisée et nous avons noté d'autre part la présence d'anticorps chez des agneaux du même troupeau. Les résultats sont en faveur de l'intervention du virus isolé, dans l'étiologie probablement complexe de l'enzootie. Un entretien défectueux et un parasitisme associé peuvent être retenus comme facteurs favorisants. D'autre part, l'intervention d'*E. coli* est certainement un élément essentiel de la gravité de l'évolution chez certains sujets.

L'isolement du virus et son étude ont été réalisés sur une souche diploïde provenant du tissu musculaire d'un fœtus ovin.

La sensibilité au virus de trois autres souches cellulaires, obtenues à partir de différents tissus, a également été démontrée. L'intérêt de ces souches, dont l'obtention est relativement facile, doit être souligné (3).

## BIBLIOGRAPHIE

1. CHARTON (A.), FAYE (P.), LECOANET (J.), LE LAYEC (Cl.), PATTE (F.). — « Etude préliminaire d'un virus hémadsorbant-hémagglutinant isolé d'une lésion de pneumonie du veau. » *Bull. Acad. Vét.*, 1965, 5, 195.
2. FAYE (P.), CHARTON (A.), LE LAYEC (Cl.). — « Présence, dans le sérum d'ovins, d'anticorps inhibant l'hémagglutination par Myxovirus parainfluenza. » *Bull. Acad. Vét.*, 1967, 4, 203.
3. HAAG (J.), SANTUCCI (J.). — « L'utilisation des souches cellulaires diploïdes en virologie. » *Bulletin Office International des Epizooties*, 1964, 61 (3-4), 255.
4. HARALAMBEV (H.) (KHARALAMBEV Kh.), SIMOV (I. V.), MERMESKI (K.). — « Immunisation of calves with an ovine Myxovirus parainfluenza 3 strain. » *Zentlb. Vet. Med.*, 1970, 17 B, 970.
5. HARALAMBEV (H.) (KHARALAMBEV Kh.). — « Comparison of Myxovirus parainfluenza 3 strains from shepp and cattle. I. Haemagglutination, haemadsorption and haemolysis. II. Antigenicity. » *Vet. Med. Nauki, Sof.* 1970, No. 7, 87-94 & No. 8, 59-62.
6. HSU (T. C.), BENIRSCHKE (K.). — « An atlas of mammalian chromosomes » Springer Verlag. 1967.
7. WILDY (P.). — « Classification and nomenclature of viruses. » Krager, 1971.