

COMMUNICATIONS

Pathogénicité résiduelle d'une souche de virus de la stomatite vésiculeuse contagieuse (Indiana) de culture cellulaire

IV. — Etude sérologique : réaction de fixation du complément spécifique et différentiel avec la fièvre aphteuse

par M^{lle} Myriam PEILLON, L. JOUBERT, M. FEDIDA
et Ph. DESMETTRE

L'étude pathogénique, virologique et histopathologique d'une souche de virus de la stomatite vésiculeuse contagieuse (SVC) de culture cellulaire en laboratoire de virologie fondamentale (Joubert et coll., 6) a été complétée par une étude sérologique en vue d'un diagnostic sérologique spécifique et différentiel d'orientation et d'urgence.

En effet, l'étroite similitude clinique de la SVC et de la fièvre aphteuse, voire, chez le porc, de la maladie vésiculeuse, exige la mise au point d'une technique sérologique de différenciation rapide et sûre, la fièvre aphteuse étant seule réputée contagieuse avec abattage indemnisé et pouvant diffuser sous le couvert d'une autre maladie virale éruptive vésiculaire.

Dans un but de normalisation des techniques, la réaction retenue pour l'étude de la SVC s'est adressée à la fixation du complément, déjà largement utilisée (BOULANGER et BANNISTER (1) ; BOULANGER (2) ; CASTANEDA et HANSON (3) ; DIMOPOULLOS et coll. (4) ; JENNEY et MOTT (5) ; RICE et McKERCHER (7) ; STONE et DELAY (8), mais en s'attachant à définir les modalités optimales d'exécution de la réaction, tant pour le diagnostic immédiat à partir d'un prélèvement de vésicule (réaction « à antigène inconnu ») que pour le diagnostic rétrospectif des anticorps du sérum des animaux ayant présenté, au cours des semaines précédentes, des lésions vésiculaires (réaction « à sérum inconnu »).

I. — MATÉRIEL, MÉTHODE ET TECHNIQUES

1^o MATÉRIEL.A) *Souches de virus.*

— *Virus d'inoculation* : Souche de sérotype Indiana C provenant de l'Institut du Radium de Paris et régulièrement cultivée sur cellules L souris sans retour à l'animal.

— *Virus de référence* : La souche de virus utilisée est la souche Indiana C provenant de l'Institut de Recherches Vétérinaires de Québec (Canada) (*). Cette souche a d'abord été cultivée sur membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés (MCA), puis passée sur lignée de cellules BHK₂₁ et sur lignée cellulaire L, avant d'être inoculée à diverses espèces (cheval, porc, ruminants, cobaye).

L'antigène est représenté :

— soit par le surnageant des cultures cellulaires infectées (BHK₂₁ ou L), ou par les MCA ;

— soit par les vésicules linguales de cheval ou podales de porc ou de cobaye, dont les lambeaux épithéliaux sont broyées à l'Ultra-Turrax TP 18, diluées au 1/10 en tampon véronal et conservées au congélateur à — 20° C.

Les vésicules linguales des ruminants inoculés n'ont pas fourni des lambeaux épithéliaux en quantité suffisante, en raison de la rapidité d'évolution des lésions nécrotiques (JOUBERT et coll., 6 I, III).

B) *Sérums.**Sérum de référence.*

C'est un sérum de bovin inoculé avec le sérotype C. Il provient également de l'Institut de Recherches Vétérinaires de Québec*.

Sérums d'animaux malades.

Sur les animaux (bovin, cheval, chèvre, mouton, porc, cobaye) qui ont reçu le virus SVC, il a été pratiqué des prises de sang 2, 4, 6 et 14 jours après l'inoculation virale, suivie de la maladie expérimentale, puis 15 jours après une ré-inoculation de virus, sans lésion

(*) Nous exprimons tous nos vifs remerciements au Docteur BOULANGER, qui a bien voulu nous faire parvenir la souche de virus, le sérum homologue, et le facteur complémentaire de bovin.

consécutives (immunité post-infectieuse) effectuées deux semaines après la primo-inoculation.

Tous les sérums sont inactivés pendant 30 mn à 56° C.

C) *Hématies.*

Hématies de mouton à 2 p. 100 diluées dans du tampon véronal à pH = 7,5.

D) *Sérum hémolytique.*

Sérum de lapin anti-hématies de mouton, de l'Institut Pasteur (Paris), dilué à 2 unités à 100 p. 100 d'hémolyse.

E) *Complément.*

Complément lyophilisé de cobaye de l'Institut Mérieux, dilué à 2 unités 100 p. 100.

F) *Facteur complémentaire.*

Il est représenté par un sérum de jeune bovin non inactivé par la chaleur (*). Il est employé à la concentration de 5 p. 100 dans le liquide de dilution du complément.

2° MÉTHODE ET TECHNIQUES.

La technique de fixation du complément est la méthode classique de type Kolmer à 100 p. 100 d'hémolyse, sur plaque. Ses conditions de réalisation (quantités, dilutions des réactifs, temps de contact, température) sont identiques à celles utilisées pour la fièvre aphteuse.

A) *Réaction à antigène inconnu et à sérum connu.*

C'est la réaction utilisée en vue d'un diagnostic précoce à partir d'un antigène inconnu (vésicules).

Le schéma de la réaction est donné dans le tableau ci-dessous.

Le sérum de référence est employé à une dilution donnant un léger excès d'anticorps.

La lecture, à l'œil nu, est interprétée en croix (4, 3, 2, 1, 0), selon le pourcentage d'hémolyse observé. Le titre de l'antigène est exprimé par l'inverse de la dilution optimale d'antigène pour laquelle on observe une absence totale d'hémolyse.

Quantités Réactifs		Quantités en ml. Température. Temps							
Ag.	Dilution .. pur	2	3	4	6	8	12	16	
	ml	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
Sérum de référence, ml		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
Complément, ml		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	
30 mn à 37 °C									
Couple hémolytique, ml		0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	
30 mn à 37 °C									

B) Réaction à sérum inconnu et à antigène connu.

Elle est effectuée sur des sérums provenant d'animaux ayant présenté antérieurement une infection vésiculeuse d'étiologie inconnue (diagnostic rétrospectif).

Le titrage des sérums s'effectue selon la technique décrite précédemment. L'élément inconnu est le sérum pour lequel on réalise une série de dilutions de raison 2. L'antigène est employé à une dilution fixe. Le titre du sérum est exprimé par l'inverse de la dilution de sérum donnant 50 p. 100 d'hémolyse.

Il est nécessaire, pour tester les sérums de *bovins* d'ajouter le facteur complémentaire * ; en son absence, le titre du sérum baisse considérablement.

II. — RÉSULTATS

1° MISE EN ÉVIDENCE DU VIRUS SVC.

En vue du diagnostic d'urgence à virus inconnu, un certain nombre d'antigènes ont été testés vis-à-vis de différents sérums ayant un titre d'anticorps suffisamment élevé et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous, aucune cospécificité sérologique n'ayant été observée entre la SVC et la fièvre aphteuse.

Sérums	Antigènes	Cheval	Bovin	Mou- ton	Chèvre	Porc	Cobaye
de cultures	BHK ₂₁	16	16	16	16	16	
	Embryo culture (MCA)	40	40	40	40	40	
	Cellules L	16	16	16	16	16	
	Cellules mousti- ques	0	4	4	4	0	
de lésions	Vésicules lingua- les cheval	10	20	10	20	10	
	Vésicules podal- les porc	—	40	—	—	40	
	Vésicules podales cobaye	20	40	40	40	40	

Il en ressort :

— que pour un même antigène, le titre antigénique est comparable quelle que soit l'origine zoologique du sérum d'animal expérimentalement infecté ;

— que les antigènes de lésions présentent une antigénicité comparable aux antigènes de culture, ceux d'embryoculture (membrane chorioallantoïdienne) paraissant toutefois supérieurs ;

— que l'antigène représenté par la culture du virus de la SVC sur cellules de moustiques (*Aedes albopictus*, JOUBERT et coll., 6, III) se montre, en revanche, très faible, en raison de la faible multiplication virale sur ces cellules, montrant seulement une infection persistante.

En pratique, le stockage au laboratoire des antigènes de la SVC peut s'adresser soit aux épithéliums lésés récoltés *in vivo*, soit à des cultures virales sur divers systèmes cellulaires, à conserver au congélateur à — 35 °C. De même, une source suffisante d'antigène pourrait être aisément obtenue par culture cellulaire en particulier sur BHK₂₁ (JOUBERT et coll., 6, III), de préférence à l'inoculation *in vivo*, par mesure de sécurité.

En outre, tout prélèvement suspect, souvent obtenu en très faible quantité, devra être divisé en deux parties, la première soumise à une sérologie immédiate — parfois négative par défaut — la seconde destinée, par sécurité, à la culture cellulaire d'enrichissement.

2° CINÉTIQUE PRÉCOCE DES ANTICORPS.

En vue du diagnostic rétrospectif, la cinétique des anticorps fixant le complément (titre exprimé en inverse de la dilution de sérum donnant 50 p. 100 d'hémolyse) a été suivie sur un certain nombre d'animaux de différentes espèces soumis à une inoculation de virus de la SVC et à une ré-inoculation 15 jours après la première (Joubert et coll., 6, I), selon le tableau ci-dessous.

Espèces (sérum) Jours après inoculation		Cheval	Bovin	Mou- ton	Chèvre	Porc	Cobaye
Primo-inoculation	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	
	6	—	—	8	4	—	
	15	4	—	64	32	4	
Réino- culation	15	64	32	64	64	64	

Les anticorps fixant le complément peuvent ainsi être mis en évidence chez les animaux ayant été infectés expérimentalement par le virus SVC. Chez le mouton et la chèvre, ils sont décelables à partir du 6^e jour après la primo-inoculation à un titre assez faible, mais ils atteignent un taux élevé 15 jours après.

Chez le cheval et le porc, il ne semble pas que la première inoculation du virus SVC provoque une montée d'anticorps très élevée.

D'une façon générale, la seconde inoculation du virus SVC révélant l'immunité (absence de lésions) agit comme une injection de rappel et les anticorps se retrouvent chez toutes les espèces, à des taux élevés, qui, dans la maladie naturelle, pourraient correspondre à des contaminations multiples, en l'absence de vaccination.

La cinétique tardive n'a pas été recherchée, en vue d'une élimination précoce à l'équarrissage d'animaux expérimentalement infectés par un virus « exotique » pour la France.

Elle ne représente du reste qu'un intérêt mineur en pratique, la sérologie étant destinée essentiellement au diagnostic du virus sur

les lésions vésiculaires précoces. D'ailleurs, la persistance des sensibilisatrices aphteuses ne dépasse pas quelques semaines et n'était digne d'intérêt qu'à l'époque révolue où l'abattage des animaux atteints et contaminés dans un foyer n'était pas immédiatement institué.

CONCLUSIONS

1° La réaction de fixation du complément est utilisable dans le diagnostic précoce ou rétrospectif de la stomatite vésiculeuse contagieuse, selon une technique simple sur plaque, transposée de celle instituée en matière de fièvre aphteuse, en vue d'un diagnostic sérologique différentiel et systématique.

2° Le diagnostic précoce à antigène inconnu utilise un antisérum de référence et s'adresse aux lésions vésiculaires linguales ou podales tant chez les espèces spontanément réceptives (cheval, bovins, ovins, caprins, porcins) que chez le cobaye.

3° Le diagnostic rétrospectif à anticorps inconnu est également possible à l'aide d'un virus de référence, mais exige, chez les bovins, l'emploi d'un facteur complémentaire ; la positivité est précoce (6^e jour), mais ne devient élevée que vers le 15^e jour suivant l'infection.

4° Les réactions sérologiques apparaissent étroitement spécifiques et ne comportent aucune communauté antigénique avec le virus aphteux.

5° Le risque de mise en circulation de certaines souches de SVC à partir de laboratoires de virologie fondamentale incite à opérer un diagnostic sérologique différentiel d'urgence avec la fièvre aphteuse devant toute maladie éruptive et vésiculaire chez les ruminants et le porc.

*Ecole Nationale Vétérinaire
Service des Maladies Contagieuses, INRA
69337 Lyon Cedex 01*

(professeur Joubert)

et

*Laboratoire de Virologie Animale
de la Direction des Services Vétérinaires
au Ministère de l'Agriculture
69342 Lyon Cedex 02*

(directeur : professeur Lucam)

BIBLIOGRAPHIE

1. BOULANGER (P.) et BANNISTER (G. L.). — A modified direct complement fixation test for the detection of antibodies in the serum of cattle previously infected with vesicular stomatitis virus. *J. Immunol.*, 1960, **85**, 368-374.
 2. BOULANGER (P.). — Technique of a modified direct complement fixation test for viral antibodies in heat inactivated cattle serum. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 1960, **24**, 262-269.
 3. CASTANEDA (J.) et HANSON (R. P.). — Complement-fixing antibodies as a measure of immunity of cattle to the virus of vesicular stomatitis New Jersey. *Am. J. Vet. Res.*, 1966, **27**, 963-969.
 4. DIMOPOULLOS (G. T.), FELLOWES (O. N.) et WASHKO (F. V.) — A serologic test for identification and titration of vesicular stomatitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, **89**, 584-587.
 5. JENNEY (E. W.) et MOTT (L. O.). — Serologic studies with the virus of vesicular stomatitis. II. Typing of vesicular stomatitis convalescent serum by direct complement fixation. *Am. J. Vet. Res.*, 1963, **24**, 874-879.
 6. JOUBERT (L.), FEDIDA (M.), PRAVE (M.), DESMETTRE (Ph.) et PEILLON (M.). — Pathogénicité résiduelle d'une souche de virus de la stomatite vésiculeuse contagieuse (Indiana) de culture cellulaire. I. Inoculation à l'animal réceptif et sensible. II. Infections humaines au laboratoire. III. Histopathologie des lésions cutanéomuqueuses et cytologie cellulaire. *Bull. Acad. Vet. France*, 1973, **85**, et 3 pages.
 7. RICE (Ch.) et Mac KERCHER (P. D.). — Studies of the complement fixation reaction in virus systems. IV. In vesicular stomatitis in horses, cattle and swine. *J. Immunol.*, 1954, **73**, 309-317.
 8. STONE (S. S.) et DELAY (P. D.). — A rapid complement-fixation test for identification of vesicular stomatitis virus in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1960, **24**, 1060-2.
-