

COMMUNICATIONS

Grippe équine. — Caractérisation de virus grippaux isolés en 1965

A. BRION, C. CATEIGNE, M. FONTAINE,
M. P. FONTAINE et R. MORAILLON

Plusieurs affections respiratoires contagieuses ont touché, depuis 1962, de nombreux effectifs équins français. Ces deux dernières années, une grippe vraie a pris la forme d'une vaste épizootie.

La physiologie clinique de la maladie variait quelque peu d'un foyer d'infection à un autre selon qu'elle évoluait seule, sans complication, ou qu'elle était accompagnée ou suivie d'une infection microbienne.

Plusieurs souches d'un même virus grippal voisin de la souche A/Equi2/Miami/63 ont été isolées de deux effectifs « Blo » et « Ru » atteints à la fin de l'année 1965. Nous rapportons ici les conditions d'isolement du virus et les données de la caractérisation sérologique de la maladie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolement du virus et caractérisation. — Les prélèvements sont constitués d'écouvillonnages profonds des cavités nasales, d'exsudat nasal, et de fragments de poumon de chevaux morts. Les prélèvements sont immergés immédiatement en solution de Hanks contenant pénicilline et streptomycine et congelés. Au laboratoire, les fragments de poumon sont broyés, centrifugés, et le surnageant sert d'inoculum. Les liquides de prélèvement sont inoculés à l'œuf embryonné de 10 jours, par voie amniotique ou allantoïdienne. Trois passages en série sont effectués sur œufs avec une incubation de 72 heures à 35°. La présence du virus dans les liquides

infectés est détectée par l'hémagglutination de globules rouges de poule. Les agents isolés au cours de ces passages reçoivent un début d'identification par les tests d'inhibition de l'hémagglutination, à l'aide d'anti-sérums vis-à-vis des virus grippaux humains A et B, de myxovirus para-influenzæ et du virus de Maladie de Newcastle.

Des essais de culture sont entrepris sur fibroblastes d'embryon de poulet et les épreuves d'hémadsorption sont faites selon la technique classique, avec des érythrocytes de poulet.

Des immun-sérums de coq sont obtenus par inoculation simultanée intra-veineuse (5 ml) et intra-abdominale (10 ml) de liquide allantoidien infecté dont le titre (sur œuf) est supérieur à 10^8 EI D50 et qui possède une hémagglutinine à un taux égal ou supérieur à 1/256 ; les coqs sont saignés pour récolte de sérum quand le taux d'anticorps inhibant l'hémagglutination est supérieur à 1/640, soit, en général, dès le 14^e jour environ après la première inoculation. A l'aide des immun-sérums de coq, des épreuves d'inhibition croisée de l'hémagglutination sont réalisées entre les souches isolées et divers myxovirus, en particulier, les souches A/Equi1/Prague/56, A/Equi2/Miami/63 et une souche équine d'origine française (A/Garches).

L'inoculation au cheval est effectuée par pulvérisation intranasale de 20 ml de liquide allantoidien titrant 10^8 EID50, dilué au 1/20 en sérum physiologique.

Examens sérologiques. — La recherche d'anticorps fixant le complément à l'aide de l'antigène A (PR-8 et A/Equi1/Prague) et celle des anticorps inhibant l'hémagglutination des virus A2/Jap/57, A/Equi1/Prague/56, A/Equi2/Miami/63 et du virus isolé comme il a été dit ci-dessus, ont été effectuées sur deux prélèvements de sérums, le sérum précoce étant prélevé 3 ou 4 jours après l'apparition du premier cas de maladie dans l'effectif et le sérum tardif, 10 jours après le premier. Pour la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, deux essais sont pratiqués, l'un sur les sérums décomplémentés et l'autre sur les sérums décomplémentés et traités au kaolin, de façon à éliminer les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination. Le traitement au kaolin supprime l'action éventuelle d'inhibiteurs non spécifiques vis-à-vis des souches équines et diminue le taux des inhibiteurs vis-à-vis de la souche A2/Japonaise (le résidu d'inhibiteurs non spécifiques disparaît par traitement au périodate).

RÉSULTATS

Isolement du virus et caractérisation. — Un virus grippal (Alfort Blo) a été isolé, dans un cas, du poumon d'un cheval mort au 8^e jour de la maladie et, dans les autres cas (Alfort Ru), d'écouvillonnages des cavités nasales de chevaux malades depuis 48 à 96 heures. Dans un foyer de grippe, 5 isolements ont été réussis à partir de 8 prélèvements. Les essais montrent que certaines conditions sont favorables à la réussite des isolements :

— prélèvement sur des chevaux en hyperthermie, atteints depuis moins de 4 jours ;

— absence d'exsudat dans les cavités nasales ;

— écouvillonnage profond des cavités nasales, congélation immédiate et transport rapide du prélèvement congelé.

Les isolements ont été obtenus simultanément par inoculation à l'œuf embryonné par les voies allantoïdienne et amniotique ; *dès la première mise en culture, un pouvoir hémagglutinant (1/4 à 1/128) du liquide allantoïque est mis en évidence.*

Au cours des passages en série sur œuf, par voie allantoïdienne, des contaminations par des levures se sont révélées. Elles se trouvent probablement, à l'origine, dans l'inoculum ; la purification a pu être obtenue par filtration, après dilution au 1/2 ou au 1/4, sur millipore (650 μ) avec une baisse du titre infectant de 4 log environ.

Au 4^e passage par voie allantoïdienne, le pouvoir infectieux du virus s'est montré égal ou supérieur à 10⁸ EID₅₀ par ml ; la lyophilisation du liquide allantoïdien brut abaisse le titre de 1 log. Les taux d'hémagglutination atteignent 1/128 à 1/5120.

Toutes les souches isolées au-delà du 4^e passage sur œuf hémagglutinent les globules rouges de poule (hémagglutination à 1/80 — 1/640), de cobaye (1/128 — 1/320), de cygne (1/80 — 1/520), de cheval (1/80 — 1/128). L'hémagglutination avec les érythrocytes d'oiseaux, notamment de cygnes, est plus rapide et peut être lue plus facilement.

Un immun-sérum de coq présentant un taux d'anticorps anti A/Equi valable est obtenu après une injection unique de virus.

Les essais de culture sur fibroblastes de poulet montrent que l'adaptation peut être obtenue par inoculations alternées, selon l'alternance 1 passage sur œuf, 2 passages sur fibroblastes, avec, sur cellules, perte du pouvoir hémagglutinant, conservation du pouvoir hémadsorbant, décelable dès la 24^e heure d'incubation, et effet cytopathique faible et incomplet.

L'inoculation au cheval provoque une maladie bénigne, après une incubation de 3 jours avec hyperthermie fugace, supérieure à 40°, et léger coryza. L'hyperthermie est accompagnée d'une leucopénie modérée qui persiste ensuite une huitaine de jours. Un cheval inoculé avait déjà, au départ, un taux d'inhibition de l'hémagglutination de 1/40 pour les virus Alfort Blo et Ru, sans doute trace d'une infection naturelle antérieure. Ce taux s'est élevé à partir du 4^e-6^e jour de l'inoculation, pour atteindre 1/160, alors qu'apparaissent aux 10^e-11^e jours, des anticorps Garches et Miami, dont le titre est resté constant à 1/40. Par contre, l'inoculation n'a provoqué aucun anticorps Prague (Tableau 1).

Les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination croisées indiquent que les souches isolées sont identiques les unes aux autres, que les deux souches retenues pour étude (Alfort Blo et Ru) sont différentes du virus A/Equi 1/Prague/56 et proches du virus A/Equi 2/Miami/63 et qu'elles diffèrent des autres virus envisagés (maladie de Newcastle, Sendai, grippal B, grippal A2 japonais, PR 8) (tableau 2).

Les souches isolées font partie du groupe A des virus grippaux, leur antigène soluble correspond à l'antigène soluble des souches grippales humaines de type A.

Résultats sérologiques (tableaux 3 et 4). —

Dans 10 sérums sur 19 provenant des chevaux atteints, des anticorps fixant le complément sont apparus, aux environs du 12^e jour après le début de la maladie dans l'effectif ; un cheval présente, au 4^e jour de la maladie de l'effectif, des taux d'anticorps à 1/25 (antigène A/humain) et 1/35 (antigène A/Equi/Prague).

Les anticorps inhibant l'hémagglutination du virus A/Equi/Alfort sont décelés dans tous les sérums vers le 12^e jour après l'apparition de la maladie dans l'effectif. Des anticorps vis-à-vis de la souche A/Equi/Prague apparaissent dans 9 sérums sur 24, et dans 2 cas, le taux des anticorps est égal ou supérieur au taux des anticorps vis-à-vis de l'antigène A/Equi/Alfort ; par ailleurs, 4 sérums précoces ont de faibles taux d'anticorps vis-à-vis de la souche A/Equi/Prague, ce qui pourrait signifier qu'une infection par ce virus, antérieure et déjà lointaine, a pu intéresser nombre d'animaux de ces effectifs. 11 sérums, au moins, possèdent, lors du 2^e prélèvement, un certain degré d'inhibition de l'hémagglutination avec la souche A/Equi/Miami ; ces faits peuvent résulter de la parenté antigénique entre les deux virus Alfort et Miami.

TABLEAU 1

Inhibition de l'hémagglutination, cheval inoculé le 4/1/66 (virus Alfort Blo), sérums traités au kaolin.

Prélèvements de sérums	<i>Antigènes</i>					
	PR 8	Miami	Prague	Alfort Blo	Alfort Ru	Garches
4 janvier	0	0	0	1/40	1/40	0
6 janvier	0	0	0	1/40	1/40	0
8 janvier	0	0	0	1/60	1/40	0
10 janvier	0	0	0	1/80	1/80	0
11 janvier	0	0	0	1/80	1/80	0
13 janvier	0	0	0	1/80	1/80	0
14 janvier	0	0	0	1/80	1/160	1/40
15 janvier	0	1/40	0	1/160	1/80	1/40
17 janvier	0	1/40	0	1/160	1/160	1/40
1 ^{er} février	0	1/40	0	1/160	1/80	1/40

TABLEAU 4. — Effectif « Blo »

Sérums chevaux	Réaction de fixation du complément. Antigènes (Dépistage au 1/16)			Réaction d'inhibition de l'hémagglutination. Antigènes								
	A/hu- main	A/Equi/ Prahá/56	Témoin	Sérums décomplémentés				Sérums décomplémentés et traités au kaolin				
				A ² /Jap/ 57	A/Equi/ Prahá/56	A/Equi/ Miami/63	A/Equi/ Alfort/65	A/Jap/ 57	A/Equi/ Prahá/56	A/Equi/ Miami/63	A/Equi/ Alfort/65	
1												
1 ^{er} prélèv.	0	0	0	1/2.560	1/40	0	0	1/320	1/40	0	0	0
2 ^e prélèv.	+	±	0	1/2.560	1/80	1/40	1/80	1/320	1/40	0	0	1/40
2												
1 ^{er} prélèv.	0	0	0	1/640	0	0	0	1/160	0	0	0	0
2 ^e prélèv.												
3												
1 ^{er} prélèv.	±	±	0	1/1.280	0	1/80	1/40	1/160	0	1/40	1/40	1/40
2 ^e prélèv.	+	±	0	1/5.120	1/80	1/640	1/1.280	1/320	1/40	1/640	1/640	1/640
4												
1 ^{er} prélèv.	0	0	0	1/2.560	1/160	0	0	1/320	1/80	0	0	0
2 ^e prélèv.	+	+	0	1/640	1/640	1/640	1/640	1/320	1/640	1/320	1/320	1/1.280
5												
1 ^{er} prélèv.	+	+	0	1/5.120	1/80	0	0	1/320	1/40	0	0	0
2 ^e prélèv.	+	+	0	1/640	1/160	1/640	1/1.280	1/320	1/160	1/160	1/160	1/1.280
6												
1 ^{er} prélèv.	±		0	1/640	0	1/160	1/160	1/160	0	0	0	1/40
2 ^e prélèv.	±	0	0	1/640	0	1/160	1/160	1/160	0	0	0	1/40
7												
1 ^{er} prélèv.												
2 ^e prélèv.	+	±	0	1/2.560	1/320	1/160	1/160	1/640	1/320	1/40	1/40	1/320
8												
1 ^{er} prélèv.												
2 ^e prélèv.	0	0	0	1/1.280	1/80	1/640	1/160	1/320	1/40	1/320	1/320	1/320
9												
1 ^{er} prélèv.												
2 ^e prélèv.	+	0	0	1/5.120	0	1/640	1/1.280	1/640	0	0	0	1/640
10												
1 ^{er} prélèv.												
2 ^e prélèv.	0	0	0	1/2.560	0	1/80	1/160	1/640	0	0	0	1/80
11												
1 ^{er} prélèv.												
2 ^e prélèv.	0	0	0	1/2.560	0	1/80	1/320	1/320	0	0	0	1/80

CONCLUSIONS

Lors de deux épizooties de grippe équine, un virus a été isolé et étudié, à partir de prélèvements d'exsudat nasal et de broyats de poumon (A/Equi/Alfort 65).

Antigéniquement différent du virus A/Equi 1/Prague 56, il semble apparenté au virus A/Equi 2/Miami 63. La sérologie permet de lui reconnaître une place spéciale dans ce dernier groupe.

Il se multiplie immédiatement sur liquide allantoïdien, sans passage préalable par voie amniotique.

Une seule inoculation au coq permet d'obtenir un immun-sérum inhibant l'hémagglutination à des taux significatifs.

Ce virus peut être adapté aux cultures de fibroblastes de poulet, par passages alternés sur œuf et sur culture tissulaire. Il perd alors son pouvoir hémagglutinant, bien qu'il demeure hémadsorbant. Son effet cytopathique est faible.

L'inoculation au cheval, par pulvérisation intranasale, reproduit une maladie hyperthermisante, avec coryza et leucopénie modérée, rappelant exactement la grippe clinique non compliquée par des infections microbiennes.

Les qualités antigéniques du virus isolé nous ont paru justifier des essais visant à l'obtention d'un vaccin. Ces essais sont en cours de réalisation. Devant l'impossibilité de mettre en œuvre une prophylaxie sanitaire efficace, il semble, en effet, que le seul moyen de lutte contre la grippe équine réside dans la protection des effectifs par un vaccin préparé à partir du virus isolé dans le pays même.
