

COMMUNICATIONS

Etude d'une souche de virus de l'avortement de la brebis isolée directement sur oeuf de poule embryonné

par P. FAYE, A. CHARTON, J. LECOANET, A. PARODI et Cl. LE LAYEC

L'isolement des souches de virus du groupe Trachome-Psittacose-Lymphogranulomatose vénérienne (virus T. P. L.), en particulier des souches de *Miyagawanella ovis*, par la méthode classique qui utilise le passage intermédiaire sur poumon de souris avant l'adaptation au sac vitellin de l'oeuf embryonné, comporte un risque : celui de faire « sortir » dès les premiers passages sur souris, non le virus que l'on cherche à cultiver, mais un virus latent chez la souris, tel que « *Miyagawanella bronchopneumonix* ». Le polymorphisme fréquent des membres du groupe T. P. L., la difficulté d'obtenir par les méthodes sérologiques des réactions dont la spécificité dépasse le niveau du groupe, peuvent donc laisser subsister une équivoque en ce qui concerne la détermination d'espèce des souches de virus T. P. L. ainsi isolées, quelle que soit la valeur des contrôles effectués sur les lots de souris utilisés. L'isolement sur péritoine de cobaye, s'il permet d'éliminer ce risque, n'est possible, cependant, que pour certaines souches.

L'adaptation directe à l'oeuf semble donc être, logiquement, la méthode de choix. Elle augmente néanmoins, considérablement, la difficulté des isolements : l'oeuf, même inoculé par la voie vitelline, la plus sensible, est assez résistant à l'infection par les virus T. P. L. et il est toujours nécessaire de multiplier, lors des premiers passages, le nombre des oeufs dont, seul, un faible pourcentage donne lieu à la survie, puis à la culture du virus inoculé. D'autre part, cette culture ne peut être obtenue que si l'inoculum est riche en particules infectantes et pauvre en bactéries de surinfection. L'élimination de

celles-ci par centrifugation différentielle est rarement complète ; l'addition d'antibiotiques à l'inoculum est donc nécessaire si l'on veut bloquer le développement toujours rapide, dans l'œuf, des quelques bactéries qui ont échappé à la centrifugation et l'on risque ainsi d'entraver, simultanément, le développement du virus (la sensibilité de certaines souches de miyagawanelles, en particulier à la pénicilline, a été soulignée maintes fois).

Quelles que soient ces difficultés, il semble néanmoins utile, dès que le prélèvement dont on dispose est assez riche en particules infectantes, dès que la rareté des bactéries permet de limiter à un taux minimum l'emploi des antibiotiques, de tenter l'isolement, d'emblée sur œuf embryonné, du virus de l'avortement de la brebis. Cette technique peut donner un résultat positif ; il est, toutefois, indiqué de tenter l'isolement, simultanément, sur souris et sur cobaye, en vue de pallier l'échec de la tentative sur œuf.

A. — TECHNIQUE D'ISOLEMENT

Le matériel utilisé à l'origine de cette expérimentation est un placenta, provenant d'une brebis d'un troupeau de l'Aube, avortée au cours du 5^e mois de gestation. Ce placenta présente, outre la lésion classique de décollement partiel des cotylédons, avec présence d'un exsudat de couleur et de consistance « purée de marrons », des aires nécrotiques, atteignant plusieurs centimètres carrés, débordant largement les zones d'insertion cotylédonnaire. A l'examen microscopique des frottis d'exsudat et de muqueuse, apparaissent de nombreux corps punctiformes, isolés ou en amas, colorés en rouge rubis, au Macchiavello, en bleu-violet, par la méthode de May-Grünwald-Giemsa, de 1/3 de micron, environ. L'exceptionnelle pauvreté du prélèvement en bactéries contraste avec sa richesse en corps punctiformes, qui, à elle seule, suffit presque pour poser d'emblée le diagnostic d'avortement à virus.

Des fragments de placenta, broyés au sable de Fontainebleau, sont mis en suspension au 1/10 dans une solution tamponnée additionnée de pénicilline (200 U. O/ml) et de streptomycine (50 mg/ μ l). Après deux centrifugations, d'abord 10 minutes à 1.000 tours/minute, à + 4 °C, puis 20 minutes à 3.500 tours/minute, à + 4 °C, le second surnageant est inoculé à l'œuf embryonné au 6^e jour d'incubation, dans le sac du jaune, à raison de 0,30 ml par œuf. 5/6 des œufs meurent dans un délai de 2 à 4 jours. Les passages suivants sont effectués, par la même voie, par inoculation de 0,30 ml d'une suspension au 1/10, en solution tamponnée, des membranes vitellines

débarrassées du jaune, récoltées après la mort des œufs, après centrifugation à 3.500 tours/minute, à + 4 °C et récolte du surnageant.

Au 5^e passage, le titre infectant pour l'œuf atteignait 10^{-4} et le délai de survie des œufs inoculés s'étendait de 24 heures (dilution 10^{-1}) à 8 jours (dilution 10^{-4}). La recherche des corps élémentaires, à l'examen microscopique des frottis de membranes, est restée négative jusque et y compris le 3^e passage. A partir du 4^e, elle est négative pour tous les œufs morts dans les trois jours suivant l'inoculation, c'est-à-dire pour la plupart des œufs ayant été inoculés à des titres supérieurs ou égaux à 10^{-2} . Par contre, à partir du 4^e jour jusqu'au 8^e, les frottis sont de plus en plus riches en corps élémentaires. Entre le 10^e et le 15^e passages, la D. L. 50 (sous volume d'inoculum de 0,30 ml) est, en moyenne, selon les passages, de 10^{-5} , et atteint fréquemment 10^{-6} . La souche a été désignée sous la dénomination A B.

B. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES DE LA SOUCHE A B EN MICROSCOPIE OPTIQUE

A partir du 4^e passage, la morphologie du virus, en ovoculture, est très proche de sa morphologie dans les lésions placentaires de la maladie spontanée : soit intracellulaires, soit libres, les corps punctiformes sont, en général, extrêmement nombreux dans les frottis. De taille variable, de l'ordre de $1/5$ à $1/3$ de micron pour les plus petits, de l'ordre de 0,5 à 1 μ , pour les plus gros, ils sont colorés en bleu-violet au Giemsa, en rouge rubis (les plus fins) ou plus rarement en bleu (les plus volumineux), au Macchiavello. Des amas de virus sont colorés en violet au Giemsa et apparaissent au Macchiavello sous forme d'une mosaïque à fond bleu sur lequel se détachent des éléments punctiformes d'un rouge intense. Ces amas, analogues aux « globi » des virus du groupe de la psittacose, sont de forme générale arrondie et leur diamètre atteint couramment 5 μ et parfois 10.

C. — CARACTÈRES NÉGATIFS DE CULTURE EN MILIEUX ARTIFICIELS

La souche A B ne cultive sur aucun des milieux artificiels utilisés au laboratoire. Le risque de confusion avec une souche de brucelle a été éliminé, en premier lieu, par le caractère négatif de tous les ensemencements pratiqués sur les divers milieux d'enrichissement et d'isolement de ce germe. La souche A B ne cultive pas sur les milieux utilisés pour les P. P. L. O. (Milieux « Difco-P. P. L. O. », additionnés de la « Fraction sérum P. P. L. O. » Difco à 1 %).

D. — CARACTÈRES SÉROLOGIQUES

Les propriétés sérologiques de la souche A B sont actuellement à l'étude. Les données fournies par les premiers essais de microagglutination sur lame et de déviation du complément utilisant des antigènes A B préparés selon diverses techniques et un antisérum A B fourni par quatre cobayes, ayant reçu trois fois, à une semaine d'intervalle, par voie intrapéritonéale, 100.000 DL 50 œuf de virus, restent étroitement limitées aux faibles taux de dilution du sérum (réactions négatives au-delà de la dilution 1/20 de sérum). Dans ces mêmes limites, les réactions de déviation du complément, effectuées parallèlement avec les antigènes A B et ornithose-psittacose en présence de l'antisérum A B, sont analogues dans leurs résultats. La réaction de microagglutination de l'antigène de la Fièvre Q (*Rickettsia Burneti*) en présence du même sérum est négative.

E. — POUVOIR PATHOGÈNE POUR LES PETITS ANIMAUX
DE LABORATOIRE

Chez la souris, l'inondation pulmonaire, par voie intranasale, avec une suspension au 1/10 de tissu placentaire en sérum physiologique, additionné de 250 microgrammes de streptomycine par millilitre, entraîne, dès le premier passage, une mortalité de 90 % dans un délai de 4 à 7 jours. Par la suite, les passages en série sont effectués par la même voie, utilisant comme inoculum le surnageant de la suspension au 1/10 d'un broyat des poumons prélevés lors du passage précédent, centrifugé à 3.500 t/m, à + 4 °C. Au cours de ces passages successifs, chez 100 pour 100 des souris inoculées, puis traitées journellement par injection sous-cutanée d'un mélange pénicilline (200 U. O.) streptomycine (0,1 mg), par sujet, la mort survient, régulièrement, à l'issue d'un délai progressivement réduit à quatre jours. Des lésions d'hépatisation rouge, siégeant principalement aux lobes apicaux, parfois à la totalité d'un poumon et à une grande partie de l'autre, s'observent sur tous ces sujets.

Le comportement des souris inoculées par voie nasale avec la souche d'ovoculture est tout à fait analogue.

Chez le cobaye, l'injection intrapéritonéale de l'inoculum utilisé pour le 1^{er} passage sur souris n'a entraîné aucune lésion. Plusieurs passages aveugles ont été effectués de cobaye à cobaye, utilisant, en injection intrapéritonéale, une suspension au 1/10, centrifugée à 3.500 tours/minute, 20 minutes à + 4 °C, des rates et vaginales

prélevées sur les sujets du passage précédent, abattus au 8^e jour. L'essai a été abandonné après le 4^e passage négatif.

Chez le poussin d'un jour, l'inoculation par voie aérienne, par nébulisation (selon une technique décrite par ailleurs) n'entraîne aucune mortalité, ni au premier passage, ni au cours des passages successivement effectués, de poussin à poussin, après abattage des sujets au 8^e jour et inoculation de surnageant de suspension au 1/10 centrifugée du broyat des poumons et sacs aériens.

Chez le poulet de 1 mois et le poulet de 2 mois, l'inoculation, dans la fente palatine, de 0,5 ml d'une suspension au 1/10 de membranes vitellines, prélevées au 5^e passage sur œuf embryonné, n'entraîne aucune évolution pathologique. Cet essai négatif prend, par ailleurs, valeur de test complémentaire de détermination de la souche AB par rapport à une éventuelle culture de corps de NELSON qui, à l'état latent dans les œufs utilisés pour l'isolement de la souche, eussent pu prendre, à l'occasion de l'inoculation du broyat de placenta et des passages aveugles consécutifs, un pouvoir pathogène pour l'œuf. Cette hypothèse était d'ailleurs improbable, du fait du caractère négatif des tentatives d'isolement d'autres virus faites sur des œufs de même origine, au cours de la même période.

L'ensemble des caractères positifs et négatifs précédents semble permettre de définir, avec un degré suffisant de probabilité, la souche AB comme un virus de l'avortement de la brebis appartenant au groupe T. P. L.

CONCLUSION

La méthode d'isolement, directement sur œuf embryonné, du virus de l'avortement de la brebis présente, malgré son caractère aléatoire, l'avantage de la rapidité, et réduit les difficultés d'identification.

*Ecole Vétérinaire d'Alfort,
Chaire de Pathologie du Bétail.*
