

Inoculation de *E. Rhusiopathiæ* par voie intradermique.

Application au titrage des vaccins et sérums contre le Rouget du Porc

par E. HARS et L.-P. DELPY

La comparaison de la valeur immunisante des vaccins contre le rouget du porc est actuellement laborieuse et incertaine, en raison des difficultés que présente l'infection expérimentale de cet animal. Les épreuves sur souris donnent certainement des indications assez exactes, mais elles ne peuvent remplacer les épreuves directes sur les animaux auxquels le vaccin est destiné.

FORTNER et DINTER (1944), reprenant les travaux de PREISZ (1891), ont proposé l'inoculation percutanée. Leur méthode consiste à faire sur les côtés du thorax et de l'abdomen des porcs, des scarifications verticales de 20 à 30 centimètres de long, de profondeur variable, qui sont ensuite enduites d'une quantité de bouillon de culture pour réaliser à coup sûr, l'infection générale. Cette méthode, acceptée par certains auteurs (TRAUB, 1947 ; BAKOS-LEHNERT, 1950), ne l'est pas par d'autres (DOYLE, 1952 ; THOMSON et GLEDHILL, 1953). Elle a fait l'objet d'une étude expérimentale de SCHUMAN (1951). Nous l'avons employée pendant deux ans faute d'en connaître une meilleure (1), mais elle ne se prête pas à des recherches expérimentales précises.

En reprenant l'étude de cette question, nous avons observé que dans tous les cas où l'infection expérimentale du porc par la méthode de Fortner et Dinter est positive, les premières manifestations sont localisées à la peau, et aux points de pénétration du virus. Plus tard seulement apparaissent les signes généraux, et notamment les localisations cutanées secondaires ; s'il n'y a pas de lésion spécifique au point d'inoculation, l'infection ne se réalise pas. Pour préciser ces observations, nous avons remplacé les scarifications par des injections intradermiques de doses mesurées d'*E. rhusiopathiæ*. Dans tous les cas, il a été constaté qu'à partir d'une certaine dose, les germes inoculés se

(1) La méthode de Doyle (1947) qui nécessite la préparation des pores :
a) en les vaccinant avec le vaccin au cristal violet ;
b) en les inoculant avec du virus pestique porcin ;
est évidemment assez compliquée.

multiplient sur place et provoquent l'évolution d'une lésion locale caractéristique, carrée, polygonale, en diamant, hémorragique, parfaitement isolée, et d'autant plus importante que la dose inoculée est plus forte. (*Fig. 1 et 2.*)

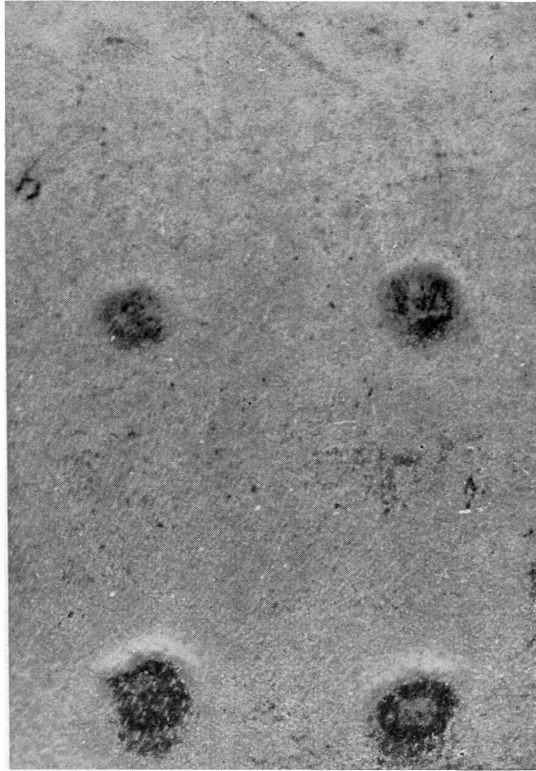


FIG. 1. — Inégalité réactionnelle de la peau très accentuée.
Réactions à 1 D.M.R. de plus en plus intenses de haut en bas.

Chez les sujets artificiellement immunisés, la réactivité de la peau s'affaiblit progressivement lorsque l'immunité s'installe, mais ne disparaît que si l'immunité est totale. Certains sujets imparfaitement immunisés peuvent tolérer sans réaction générale une dose mortelle pour un sujet neuf, mais ils présentent cependant une réaction locale. Par contre, un sujet qui tolère sans réaction locale une dose d'épreuve, mortelle pour les témoins, ne présente pas de réaction générale.

Tout se passe comme si la peau était l'organe le plus difficile à immuniser. Nous avons donc pensé qu'il suffisait de mesurer

le degré d'immunité de la peau pour apprécier l'état d'immunité générale de l'individu.

Stabilisation et étalonnage du matériel d'épreuve

Les réactions locales produites chez le porc par l'injection intradermique d'*E. rhusiopathiæ* sont fonction, d'une part, de la virulence de la souche et de la dose injectée, d'autre part, de la réceptivité du sujet.

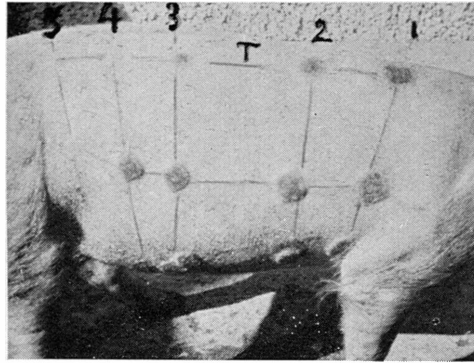


FIG. 2. — Détermination de la D.M.R. : de 1 à 5 : doses décroissantes de 100.000 à 10 bacilles. La D.M.R. est comprise entre 10 et 100 bacilles (mélanges 5 et 4).
Noter la faible réactivité du tégument lombaire.

Il apparaît donc que pour apprécier la réceptivité relative d'un porc mis en expérience, il suffit de disposer d'un matériel virulent stabilisé et étalonné. En partant d'une souche de virulence moyenne (*E. 43*), nous avons préparé des suspensions réparties en ampoules et lyophilisées, de telle sorte que chaque ampoule renferme, après lyophilisation, environ 2 milliards de bacilles vivants.

Avec ce matériel de référence étalonné, nous avons préparé des séries de dilutions renfermant théoriquement : 10, 100, 10.000, etc., bacilles, et nous avons recherché les réactions produites sur un même porc par l'injection intradermique, sous un volume de 0,2 centimètres cubes, d'une série de dilutions. Les réactions obtenues sont grossièrement proportionnelles au nombre de germes inoculés. Si par exemple, la plus petite lésion perceptible après quarante-huit heures, correspond à la dose de 10 bacilles, 100 bacilles provoquent une lésion caractéristique de 2 centimètres de côté, et les suspensions concentrées, des lésions de plus en plus grandes et saillantes. En outre, l'apparition de ces lésions est plus précoce. (*Fig. 2.*)

Il est commode d'employer les unités de mesure suivantes :

Dose minima réactionnelle (D.M.R.) : Le plus petit nombre de bacilles qui, inoculés dans l'épaisseur du derme, sous un volume de 0,2 centimètre cube, peut faire apparaître dans un délai de quarante-huit heures une lésion spécifique.



Fig. 3. — Inégalité réactionnelle de la peau peu accentuée.
Les trois séries d'injections sont faites avec 1 D.M.R. (souche de référence E. 43).
Les lésions sont de plus en plus saillantes de haut en bas.

Chez des porcs très réceptifs, la D.M.R. de notre souche E. 43 renferme théoriquement 100 bacilles. Ceci veut dire qu'une dose de 0,2 centimètre cube de suspension (renfermant théoriquement 100 bacilles, mais en réalité de 20 à 140) peut provoquer chez des porcs très sensibles, une lésion spécifique minimale.

La dose sûrement réactionnelle (D.S.R.) : renferme 10 D.M.R., c'est-à-dire pour la souche de référence E. 43, 1.000 bacilles. En l'état actuel de nos recherches, cette dose provoque la constitution d'une lésion caractéristique chez tous les porcs réceptifs au rouget.

Enfin, la dose d'épreuve (D.E.) : qui renferme 10.000 D.M.R., soit théoriquement 1.000.000 de bacilles, est telle que seuls les porcs totalement immunisés la tolèrent sans réaction.

Variation de la réactivité cutanée

La réactivité cutanée varie, comme la sensibilité à *E. rhusiopathiæ* avec les races ou même les individus. L'influence des variations raciales ou individuelles est nulle lorsque les séries d'inoculations nécessaires pour un titrage ou un contrôle sont effectuées sur un seul animal.

Dans les autres cas, les injections témoins pratiquées avec une suspension de référence étalonnée permettent d'apprécier le degré de réceptivité de chaque sujet.

Cependant, chez certains porcs, la réactivité du revêtement cutané n'est pas absolument égale en tous les points. Il convient donc de limiter les injections aux deux grands rectangles latéraux limités en avant par l'épaule, en arrière par la hanche, en évitant la région lombaire peu réactive et la région ventrale qui l'est trop. Ces différences de réactivité n'influencent pas tant la surface des lésions que leur turgescence. (Fig. 3 et 1.)

Applications pratiques

Première application : appréciation de la virulence de souches inconnues

(FIG. 4 ET 5)

Il est possible de mesurer la virulence relative de 10 à 12 souches sur un seul porc, en procédant comme suit :

A partir de chaque souche à éprouver, on prépare trois suspensions bacillaires homogènes. La moins concentrée doit renfermer théoriquement, dans 0,2 centimètre cube, le même nombre de bacilles que la D.M.R. de la suspension de référence étalon. La seconde est dix fois plus concentrée que la première, et la troisième cent fois plus. On trace sur la peau du porc trois lignes horizontales écartées de 10 centimètres et autant de verticales, plus une, que de souches à essayer. Rien n'empêche d'utiliser les deux côtés du corps. Les intersections de ces lignes déterminent autant de points d'inoculation.

On procède alors aux injections en utilisant une seringue pour chaque souche, et en allant de la suspension la moins dense à la plus dense.

EXPÉRIENCE n° 19/42

Matériel de référence : Souche E. 43.

1 D.M.R. = 100 bacilles.

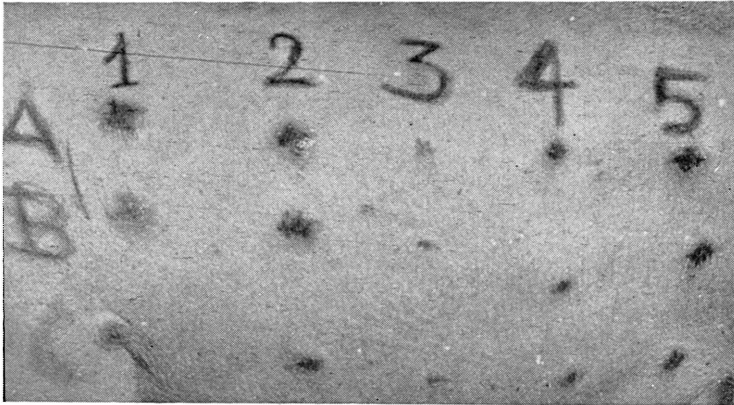
Souches à titrer = n° 1 à 4.

1° A partir de chaque souche préparer des suspensions bacillaires de concentration A, B, C.

A = 10.000 bacilles,

B = 1.000 bacilles,

C = 100 bacilles (comme dans la D.M.R. étalon).



4



5

FIG. 4 et 5. — Comparaison de 10 souches sur un seul porc par inoculation intradermique de 100 bacilles (0,2 cm³)

5 et 6 = souche de référence (1 D.M.R.),

1, 2, 11 = souches plus virulentes que l'étalon,

7, 8, 10, 12 = souches de même virulence que l'étalon (10 est une souche d'endocardite),

4, 3, 9 = souches moins virulentes que l'étalon.

2° Sur la peau rasée d'un porc tracer six lignes verticales espacées de 10 centimètres correspondant respectivement aux souches à titrer, et à

l'étalon, soit 1, 2, 3, 4, 5 (étalon). Tracer ensuite trois lignes horizontales espacées de 10 centimètres ; la ligne supérieure correspondant aux suspensions A, la moyenne aux suspensions B, et l'inférieure aux suspensions C. Chaque point d'intersection correspond donc à une des trois suspensions de chaque souche ;

3° Procéder à trois injections de 0,2 centimètre cube sur chaque verticale, en commençant par le point inférieur 1-C, qui correspond à la suspension la moins dense. Il faut ainsi changer de seringue pour chaque souche, mais non pour chaque suspension ;

4° Après vingt-quatre et quarante-huit heures, lire les réactions par comparaison avec les trois réactions de la verticale témoin. On peut ainsi apprécier si la D.M.R. de chaque souche inconnue est égale, plus petite ou plus grande que la D.M.R. étalon.

Seconde application : Contrôle de l'efficacité des vaccins

Que l'on se propose de rechercher la dose immunisante d'un vaccin ou de comparer plusieurs vaccins, il faut employer autant de groupes d'animaux que d'antigènes à essayer.

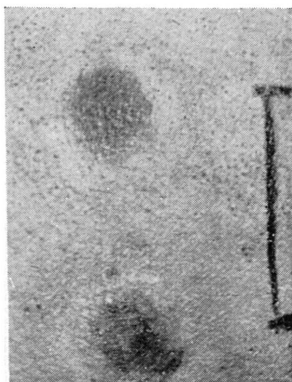


FIG. 6. — Sujet neuf. 1 D.M.R.
(10^2 bacilles)
48 heures — réaction normale.

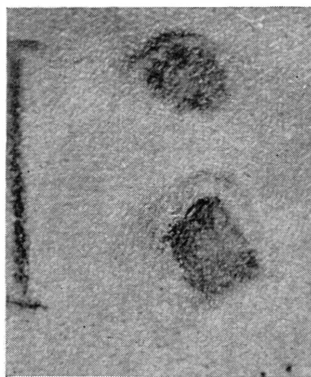


FIG. 7. — Sujet vacciné. 1 D.E.
(10^6 bacilles)
48 heures — immunité insuffisante.

Chaque groupe est vacciné et, douze jours plus tard, éprouvé avec la souche de référence étalon en même temps que les témoins. Lorsque la réceptivité des porcs en expérience est inconnue, il est préférable d'injecter aux vaccinés comme aux témoins, en trois points, 1 D.M.R., 1 D.S.R. et 1 D.E.

Si la réceptivité des animaux est normale, les témoins présenteront les trois réactions caractéristiques. Parmi les vaccinés, seront seuls considérés comme immuns ceux qui ne présenteront aucune réaction. Si les sujets sont peu réceptifs, la comparaison

des réactions chez les témoins et les vaccinés permettra de faire la part de la résistance naturelle et de l'immunité due au vaccin. Lorsque la réceptivité des pores est connue, il suffit d'injecter à chaque vacciné une dose d'épreuve (1.000 D.S.R.) en deux points distincts et aux témoins une D.S.R. en deux points distincts. Les photographies 6, 7, 8 illustrent un exemple simple.

La ligne verticale tracée près des lésions représente 10 centimètres. Le n° 6 est le témoin qui, inoculé avec 1 D.S.R. en deux points, a donné des réactions prouvant une bonne réceptivité.

Les n^{os} 7 et 8 ont été vaccinés avec des antigènes différents et éprouvés avec 1 D. E. (1.000 D.S.R.) en deux points.



FIG. 8. — Sujet vacciné. 1 D.E. (10^6 bacilles)
48 heures — immunité parfaite.

Le vaccin 7 présente une efficacité insuffisante. Le 8 a donné une immunité parfaite. Il n'est pas inutile de mentionner qu'après lecture des résultats (48 heures), les témoins et les vaccinés insuffisamment immunisés peuvent être traités par la pénicilline pour éviter tout danger de généralisation. Le prix de revient des expériences est donc très bas. La même remarque s'applique aux autres applications de la méthode.

Troisième application : Titrage d'un sérum anti-rouget

La méthode consiste à injecter dans le derme d'un même animal, sous un volume uniforme de 0,2 centimètre cube, des séries de mélanges constitués par des dilutions croissantes des sérums à titrer et un nombre fixe de doses de la suspension d'épreuve étalon. En même temps, le sujet est inoculé avec une seule des doses étalon choisies, sans addition de sérum, pour évaluer sa sensibilité.

TITRAGE DU SÉRUM M. 574 CONTRE LE SÉRUM ÉTALON 3093

Les dilutions et mélanges sont effectués comme suit :

NUMÉRO DES MÉLANGES		VOLUME DE SÉRUM (M 574 ou 3.093)	NOMBRE de D.S.R.
SÉRUM 3093	SÉRUM M 574		
1	10	0,1	100
2	20	0,1	1000
3	30	0,01	1000
4	40	0,001	1000
5	50	0,0001	1000
6	60	0,00001	1000

Laisser en contact 30 minutes.

Inoculation et résultats (Fig. 9 et 10) :

- 1° Les mélanges 1 à 6 sont injectés sur le côté gauche, 10 à 60 sur le côté droit du porc ;
- 2° Les injections sont faites d'avant en arrière dans l'ordre suivant : 1 ou 10, 2 ou 20, 3 ou 30, témoin, 4 ou 40, 5 ou 50, 6 ou 60 (1 D.S.R.).

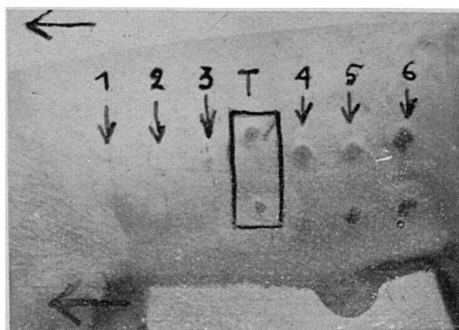


FIG. 9. — Sérum 3.093 — côté gauche du porc.

La figure 1 correspond au sérum étalon 3093, la figure 2 au sérum à titrer M. 574.

Sérum étalon : Les mélanges 1, 2 et 3 n'ont pas provoqué de réaction. Donc, il suffit de 0,01 centimètre cube de ce sérum pour neutraliser 1000 D.S.R.

Sérum à titrer : Seuls les mélanges 1 et 2 n'ont pas provoqué de réaction. Donc, il faut 0,1 centimètre cube de ce sérum pour neutraliser 1000 D.S.R.

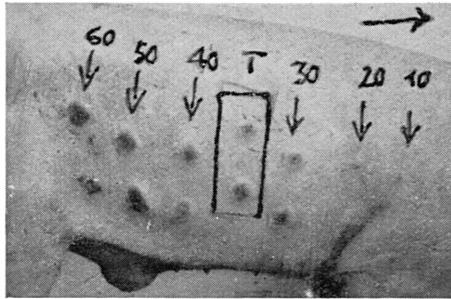


FIG. 10. — Sérum M. 574 — côté droit du même porc.

T = injection de 800 bacilles sans sérum.

1 à 6 et 10 à 60 = mélanges constitués par 10^6 bacilles

+ doses de sérum allant de 10^4 à 10^5 ,

La réaction est inhibée avec 0,01 cm³ de sérum 3.093 (N° 3)

et 0,1 cm³ de sérum M. 574 (N° 20).

En d'autres termes, le sérum étalon est de 1 à 10 fois plus actif que le sérum à titrer, et, comme l'étalon titre 700 unités souris, le sérum M. 574 a un titre compris entre 70 et 700 unités. Un second titrage permettra d'obtenir une évaluation à 50 unités près.

Conclusions et résumé

Les résultats obtenus par la méthode qui est ici exposée, ont été comparés avec les résultats des méthodes déjà connues, qui sont basées sur l'infection générale des souris et des porcs. Nous n'avons relevé aucune discordance.

Les avantages de la méthode intracutanée combinée avec l'emploi d'un matériel de référence stabilisé et étalonné sont :

a) La précision qui résulte de la mesure exacte du matériel virulent, de la sûreté de l'inoculation et de la nature de la réaction. Nous aurions pu, à l'exemple de certains auteurs américains, essayer d'établir des relations numériques entre la surface des réactions et le nombre de germes inoculés. Comme la turgescence et l'aspect général des réaction, qui sont difficiles à exprimer par des chiffres, sont aussi significatifs que la surface, nous pensons que pour le moment la simple comparaison visuelle est préférable;

- b) La commodité d'exécution. Il est plus facile de faire 30 injections sur un porc qu'une seule injection sur 30 porcs;
- c) La suppression des erreurs dues aux différences de sensibilité raciales ou individuelles ;
- d) La réduction des frais d'expériences.

Résumé

1° L'injection dans le derme cutané du porc de suspensions titrées d'*E. rhusiopathiæ* provoque l'évolution au point d'inoculation d'une lésion spécifique dont l'importance est fonction :

- a) De la dose inoculée (virulence de la souche et nombre de bacilles),
- b) De la réceptivité du sujet;

2° L'un de ces facteurs étant rendu constant, la lecture des réactions permet de mesurer l'autre ;

3° La méthode a permis trois applications pratiques : évaluation de souches inconnues, mesure de l'efficacité des vaccins, titrage de sérum anti-rouget. Les résultats obtenus concordent avec les résultats fournis par les méthodes basées sur l'infection générale des sujets ;

4° La méthode proposée est précise, peu coûteuse, et d'exécution facile.

*Institut Mérieux,
Laboratoires de Marcy-l'Etoile.
(Rhône).*

BIBLIOGRAPHIE

- BAKOS (K.) et LEHNERT (E). — *Nord Vet. Med.*, 1950, **2**, 113.
 DOYLE (T.-M.). — *Office Inter. Epizoties*, 1952, **38**, 40.
 FORTNER (J.) et DINTER (Z.). — *Z. Infekt. Kr. Haust.*, 1944, **60**, 157.
 PREISZ (H.) et al. — *Handb. Path. Microorg.*, 1929, VI, 449.
 SHUMAN (R.-T.). — 88° Meeting de l'AUMA, *Proc. Book*, 1951, **153**, 160.
 THOMSON et GLEDHILL. — *Vet. Rec.*, 1953, **65**, 40.
 TRAUB (E.). — *Mh. Vet. Med.*, 1947, 165.
 WATTS (P.-S.). — *J. Path. Bact.*, 1940, **50**, 353.

Discussion

M. GUILLOT. — Enveloppez-vous vos porcs ?

M. DELPY. — Non.

M. GUILLOT. — Et ils ne se frottent pas ?

M. DELPY. — Non, les porcs ne se frottent pas. Nous inoculons 0,2 cm³.

M. GUILLOT. — Mais lorsque la lésion est développée ?

M. DELPY. — Il est possible alors que les porcs se frottent, mais cela n'altère pas les caractères de la lésion. Au début la lésion n'est pas saillante; on voit apparaître très nettement un rectangle ou un carré. Entre la 24^e heure et la 48^e heure il n'y a pas d'altération des lésions; si l'on prolonge l'expérience plus longtemps une généralisation secondaire se produit et les lésions sont plus visibles.

M. GUILLOT. — La netteté des anneaux sur la photo montrait bien évidemment qu'il n'y avait pas de possibilité de frottement.

M. DELPY. — Je ne dis pas que le frottement ne peut pas se produire, mais nous avons procédé sans précautions extraordinaires, les porcs étaient par groupes de 4 ou 5 dans un box, et les photos que vous venez de voir ont été prises sans précaution.

M. FORGEOT. — Vous obtenez en somme une eschare pure, sans suppuration.

M. DELPY. — Par raison d'économie nous n'attendons pas l'évolution, dès que nous avons fait la lecture nous traitons les animaux par la pénicilline. Cependant dans certains cas nous avons voulu voir si l'on pouvait infecter les cochons par cette méthode, si l'on pouvait donner le rouget généralisé. Je crois que c'est une méthode d'infection beaucoup plus sévère que celle de DINTER et BAKOS. Si on ne traite pas les animaux par la pénicilline il se produit une infection grave et, dans nos expériences, mortelle. Je crois que la voie cutanée pure est certainement la voie de choix dans l'infection du cochon.
