

Contribution à l'étude de la virémie chez le mouton inoculé avec le virus de la Fièvre Aphteuse (*)

M. B. MASTAN, C. DUBOUCLARD (**)

La fièvre aphteuse se manifeste chez le mouton par un ensemble de symptômes dont les plus fréquemment rencontrés sont l'hyperthermie et l'apparition de lésions buccales et podales. Mais ce tableau clinique complet est plutôt exceptionnel, ce qui rend parfois difficile le diagnostic de cette maladie dans de grands troupeaux et explique le rôle que joue cet animal au cours de la diffusion de la fièvre aphteuse dans certains pays, surtout lors de la transhumance.

Les études antérieures ont porté sur les symptômes et les lésions après infection expérimentale et sur la vaccination du mouton (1, 2, 3, 6, 7, 8). Au cours de nos recherches, nous avons remarqué (4, 5) que le seul critère constant, chez le mouton inoculé par le virus de la fièvre aphteuse, était la présence de virus à un taux significatif dans le sang de l'animal. Cette méthode nous a dès lors servi à apprécier la vaccination du mouton et nous envisagerons ici quelques résultats obtenus par recherche de la virémie.

Cette étude nous a permis,

- de rechercher d'une part le prélèvement à effectuer (plasma ou sérum) et les conditions optima d'examen: examen immédiat ou après conservation à + 4° et — 30° C,
- d'effectuer d'autre part la cinétique de la virémie chez les moutons inoculés expérimentalement.

I. MATÉRIEL et METHODES

1. Moutons.

Nous choisissons des moutons non vaccinés contre la fièvre aphteuse, âgés de plus de 6 mois, en lots aussi homogènes que possible.

2. Virus.

L'infection expérimentale est réalisée en inoculant par la voie sous-muqueuse 10.000 DECP 50 (*) de virus obtenu sur culture de cellules rénales de mouton en monocouche. Le virus d'inoculation des cultures cellulaires a été préalablement adapté au mouton par passages successifs (5).

(*)Bull. Acad. Vét. — Tome XL (Octobre 1967). —

(**) Institut Français de la Fièvre Aphteuse (Lyon).

3. *Prélèvement de sang.*

Un échantillon de sang est prélevé à la veine jugulaire, d'une part sur solution anticoagulante d'Alsever pour obtenir le plasma par centrifugation, d'autre part sans anticoagulant, ce qui permet, après 2 heures à la température du laboratoire et une nuit à + 4°, de recueillir le sérum par centrifugation.

4. *Titration des prélèvements et contrôle de la virémie sur cellules rénales primaires de porc*

La culture des cellules est effectuée en solution de Earle additionnée de 0,5 p. 100 d'hydrolysate de Lactalbumine et de 5 p. 100 de sérum de veau sans anticorps antiaphteux. Lorsque la couche cellulaire est complète, c'est-à-dire aux environs du 5^e jour, les tubes de culture sont utilisés.

On titre le plasma ou le sérum en milieu de Hanks additionné de 0,5 p. 100 d'hydrolysate de Lactalbumine, 1 ml de chaque dilution par tube, 5 tubes par dilution, intervalle logarithmique de dilution: 1.

Le contrôle de routine de la virémie est effectué en inoculant 4 tubes de culture cellulaire pour chaque prélèvement, à raison de 0,1 ml par tube.

Les cultures cellulaires qui, en 72 heures, présentent un effet cytopathogène, permettent de calculer le titre (exprimé en DECP 50/ml). La nature du virus est confirmée par la réaction de fixation du complément.

5. *Souches de virus étudiées.*

La cinétique de la virémie a été étudiée avec les virus "O Flandres 47", "A Allier 60", "C Vosges 60".

II. RÉSULTATS

1. *Cinétique de la virémie.*

A. *Virus "O Flandres 47".*

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec le virus O Flandres 47. En effet, sur 8 moutons, 2 à 5 prélèvements ont été effectués; sur 2 animaux, la température rectale a été notée. Les résultats (figure n° 1) sont illustrés par deux diagrammes (figures n° 2 et 3).

Le titre du virus dans le sang des moutons, déjà important à la 10^e heure, augmente pour être maximum entre 28 et 45 heures, mais est très bas à 72 heures. Le titre maximum obtenu est de 10^{1.5} /ml.

(*) DECP 50: dose de virus provoquant l'effet cytopathogène dans 50 p. 100 des tubes.

COMMUNICATIONS

Figure n° 1 : Cinétique de la virémie chez huit moutons inoculés expérimentalement avec le virus « O Flandres 47 »

Mouton n°	Nombre d'heures après inoculation	Titre du virus contenu dans les échantillons (log DECP 50) *				Température rectale
		Plasma frais	Plasma - 30° 1 semaine	Sérum frais	Sérum - 30° 1 semaine	
1	24	3,2	3,5	3,25	—	—
	48	3,7	3,2	2,75	—	—
	72	< 0,5	—	—	—	—
	96	< 0,5	—	—	—	—
2	24	2,2	< 0,5	< 0,5	—	—
	48	1,2	3,4	1,75	—	—
	72	< 0,5	—	—	—	—
	96	< 0,5	—	—	—	—
3	24	1,5	—	< 0,5	—	—
	48	0,8	—	1,5	—	—
	72	< 0,5	—	< 0,5	—	—
	96	1	—	< 0,5	—	—
4	24	2,6	—	2,6	—	—
	48	1,5	—	2,5	—	—
	72	< 0,5	—	< 0,5	—	—
	96	0,8	—	< 0,5	—	—
5	24	3,6	—	—	—	—
	48	3,5	—	—	—	—
6	24	5,2	—	—	—	—
	48	4,4	—	—	—	—
7	10	2,5	3,4	2,8	3,2	39° 7
	22	2,8	3,6	3,5	3,5	40°
	28	4,4	4,6	> 4,5	5,2	41° 2
	34	> 4,5	4,2	4,4	4,5	40° 6
	45	4,2	4,2	3,6	3,8	40° 7
8	10	1,8	2,4	1,5	1,5	39° 7
	22	2,8	2,5	2,5	2,5	39° 6
	28	2,5	2,5	2,5	2,6	39° 2
	34	2,8	2,5	3,2	2,8	39° 2
	45	3,4	3,5	3,5	3,6	40° 1

* DECP 50 = Dose effet cytopathogène 50 % sur culture de cellules primaires de rein de porc.

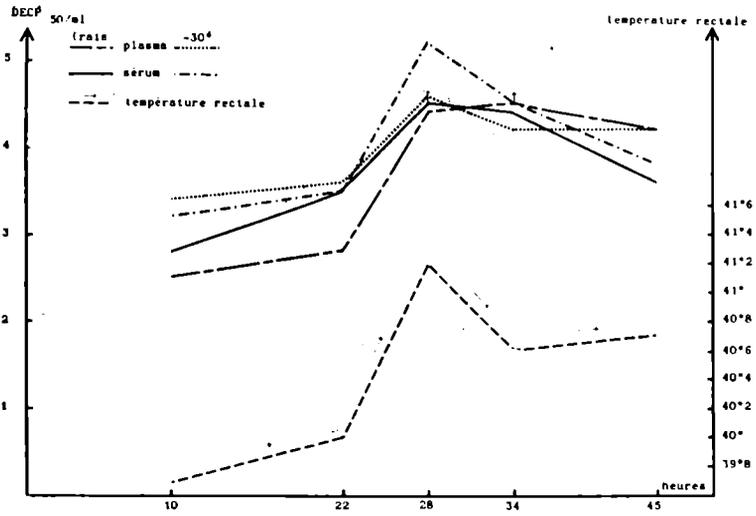


FIG. 2. — Cinétique de la virémie chez un mouton inoculé expérimentalement avec le virus « O Flandres 47 »

COMMUNICATIONS

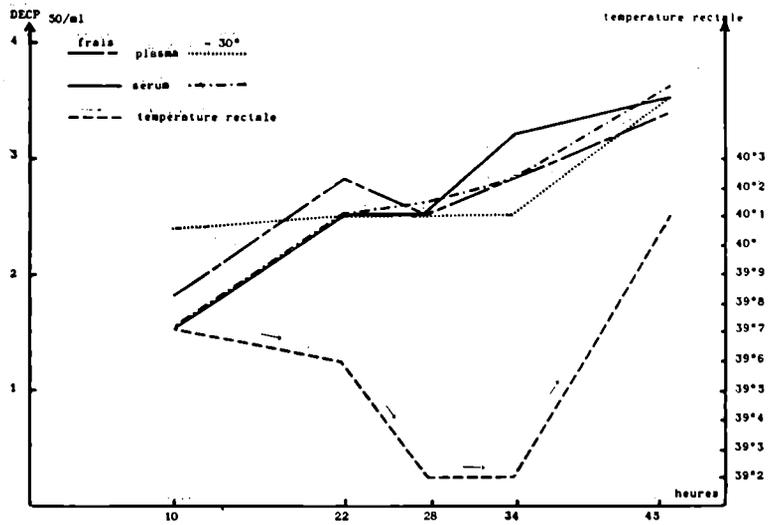


FIG. 3. — Cinétique de la virémie chez un mouton inoculé expérimentalement avec le virus « O Flandres 47 »

B. Virus "A Allier 60".

L'étud de la virémie sur un mouton (figure n° 4) montre un titre voisin de $10^{3.5}$, constant de 22 à 47 heures.

Mouton n°	Nombre d'heures après inoculation	Titre du virus contenu dans l'échantillon (log DECP 50) *			
		Plasma frais	Plasma — 30° 1 semaine	Sérum frais	Sérum — 30° 1 semaine
1	22	3,4	3,5	3,4	2,8
	29	3,4	3,2	2,8	3,8
	47	3,2	2,8	3,4	3,4

* DECP 50 = Dose effet cytopathogène 50 % sur culture primaire de cellules de rein de porc.

Figure n° 4 : Cinétique de la virémie chez un mouton inoculé expérimentalement avec le virus « A Allier 60 ».

C. Virus "C Vosges 60".

L'étude de la virémie sur deux moutons (figure n° 5) montre un titre de 10^3 à 10^4 , à peu près constant de 24 à 48 heures.

Mouton n°	Nombre d'heures après inoculation	Titre du virus contenu dans l'échantillon (log DECP 50) *			
		Plasma frais	Plasma — 30° 1 semaine	Sérum frais	Sérum — 30° 1 semaine
1	24	2,8	3,6	2,8	3,6
	48	2,6	3,5	3,6	4,2
2	24	3,4	4,2	4,2	3,5
	48	3,2	4,2	3,6	3,8

* DECP 50 = Dose effet cytopathogène 50 % sur culture primaire de cellules de rein de porc.

Figure n° 5 : Cinétique de la virémie chez deux moutons inoculés expérimentalement avec le virus « C Vosges 60 »

2. Recherche de la meilleure méthode d'examen.

Les résultats des différentes figures (n° 1 à 6) montrent que l'on obtient les mêmes titres avec le sérum ou le plasma. De plus, la conservation des prélèvements à -30°C pendant une semaine n'influe pas sur le titre, tandis que la conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ donne des titres légèrement inférieurs (figure n° 6).

Les contrôles de routine effectués sur des plasma frais et sur des plasma conservés à -30°C pendant une semaine montrent que les prélèvements qui, frais, se révélaient positifs sur un seul tube par exemple, étaient négatifs après conservation à -30° . Il peut s'agir d'une destruction du virus par suite de la conservation ou de la congélation ou simplement, de variation normale de l'échantillonnage.

Figure n° 6 : Influence de la conservation sur les titres infectieux du sérum ou du plasma (log DECP 50)

Premier essai : virus « O Flandres 47 »

	Mouton n° 7		Mouton n° 8	
	24 h	48 h	24 h	48 h
	après inoculation		après inoculation	
Plasma frais	3,2	3,7	2,2	1,2
Plasma conservé 24 heures à $+4^{\circ}$...	3,7	—	3,5	—
Plasma conservé 72 heures à $+4^{\circ}$...	3,2	—	2,2	—
Plasma conservé 1 semaine à $+4^{\circ}$...	2,5	2,8	< 0,5	1,8
Plasma conservé 24 heures à -30° ...	1,7	—	1,5	—
Plasma conservé 72 heures à -30° ...	3,5	—	1,7	—
Plasma conservé 1 semaine à -30° ...	3,5	3,2	< 0,5	3,4
Sérum frais	3,2	2,7	< 0,5	1,7
Sérum conservé 72 heures à $+4^{\circ}$...	< 0,5	—	< 0,5	—
Sérum conservé 1 semaine à $+4^{\circ}$...	2,8	2,6	< 0,5	1,5

Deuxième essai : virus « O Flandres 47 »

	Mouton n° 1			Mouton n° 2	
	22 h	28 h	45 h	22 h	28 h
	après inoculation			après inoculation	
Plasma frais	2,8	4,4	4,5	2,8	2,5
Plasma conservé 1 semaine à $+4^{\circ}$...	2,6	4,4	4,2	2,2	2,8

III. CONCLUSIONS

Nous n'avons recherché la virémie chez le mouton qu'à partir de la 10^e heure avec le virus "O Flandres", de la 22^e heure avec le virus "A Allier", de la 24^e heure avec le virus "C Vosges".

Dix heures après inoculation par voie sous-muqueuse, nous avons déjà un titre significatif du plasma: $10^{1.5}$ à 10^3 . Ce titre augmente pratiquement jusqu'à la 48^e heure et diminue à la 72^e heure. A la 96^e heure après infection, notre méthode de routine ne nous permet pas de déceler le virus (4).

Le titre est maximum de 22 à 48 heures pour les 3 types de virus étudiés et se situe autour.

- de $10^{1.5}$ pour le virus "O Flandres 47",
- de $10^{3.5}$ pour le virus "A Allier 60",
- de $10^{3.6}$ pour le virus "C Vosges 60".

Il semble indifférent d'utiliser le sérum ou le plasma, mais préférable d'effectuer des examens le plus tôt possible et, en cas d'impossibilité, de conserver les prélèvements à — 30° C.

Lorsque nous avons établi la dose vaccinante 50 p. 100 du mouton, du virus n'était pas mis en évidence dans le sang circulant chez les moutons vaccinés avec une dose suffisante de vaccin, tandis qu'il l'était toujours chez des animaux vaccinés avec des doses plus faibles de vaccin, ou non vaccinés. C'est l'ensemble de ces résultats sur la virémie qui nous a permis de mettre au point une méthode de contrôle du vaccin antiaphteux sur le mouton et essentiellement d'étudier la protection de cet animal.

Nous avons toujours noté la présence de virus dans le sang d'animaux inoculés expérimentalement alors que les lésions aphteuses macroscopiques faisaient le plus souvent défaut. Cette inconstance de l'apparition des lésions a été aussi rencontrée dans la nature, notamment en Iran sur des agneaux âgés de moins de 6 mois. On conçoit ainsi aisément le danger de dissémination de la maladie que représentent les troupeaux dans lesquels la fièvre aphteuse n'est pas diagnostiquée ou diagnostiquée tardivement. Ceci souligne le rôle important que peut jouer le mouton dans la propagation des épizooties.

BIBLIOGRAPHIE

1. CARDASSIS (J.), PAPPOUS (C.), BROVAS (D.), STOURAITIS (P.), SEIMINIS (A.). — Essais d'infection et de dosage du vaccin antiaphteux chez le mouton. Réunion Comm. Europe. de Lutte contre la Fièvre Aphteuse, FAO, Lyon, 28 septembre — 1^{er} octobre 1965.
2. CIACCO (G.), GIROUD (P.). — Anticorps neutralisants produits chez le bovin et chez le mouton par une souche de virus aphteux du groupe C adaptée à la souris. *Ann. Inst. Pasteur*, **103**, (2), 1962, p. 293-296.
3. DELLERS (R. W.), HYDE (J. L.). — Response of sheep to experimental infection with foot-and-mouth disease virus. *Amer. J. Vet. Res.*, **25**, (105), 1964, p. 469-473.
4. FONTAINE (J.), DUBOUGLARD (C.), BORNAREL (P.). — Vaccination antiaphteuse du mouton. Recherche d'une méthode de contrôle de l'immunité. *Bull. OIE*, **65**, 1966, p. 195-212.
5. FONTAINE (J.), BORNAREL (P.), DUBOUGLARD (C.), STELLMANN (C.), LANG (R.). — Vaccination antiaphteuse du mouton. Réunion annuelle du Groupe de Recherches, FAO, Pirbright, septembre 1966.

6. RIVENSION (S.), SEGURA (M.), ZAKIN (M. M.). — Anticuerpos en ovinos infectados experimentalmente y vacunados contra la fiebre aftosa. *Rev. Invest. Agropec.*, **1**, (14), 1964, p. 171-179.
7. VIVIANO (C.) — La fièvre aphteuse chez les moutons. Laboratoires de Recherches de l'Institut National de la fièvre aphteuse, Buenos-Aires, Argentine Publication 1949 (6).
8. WYNOHRADNYK (V.), POPOVICI (V.). — Méthode de fixation du complément pour la mise en évidence des anticorps fixateurs dans le sérum d'animaux convalescents de fièvre aphteuse ou vaccinés. *Bull. OIE.*, **55**, 1961, p. 1448-1464.