

La Fièvre Aphteuse et la méthode de préparation du vaccin anti-aphteux en Iran

par

H. RAMYAR, M. AMIGHI et M. HESSAMI (1)

En Iran, les bovins jouent un rôle assez important non seulement dans la production du lait et de la viande mais aussi pour le travail qu'ils fournissent puisque ces animaux sont utilisés largement dans diverses tâches agricoles.

L'épizootie de fièvre aphteuse qui, en raison du système d'élevage et du nomadisme, se répand très facilement dans le pays, cause des dégâts considérables.

Épizootologie.

La maladie sévit presque toute l'année, quelle que soit la saison, sous forme enzooto-épizootique. Elle se manifeste chez les bovins, le buffle, le mouton, la chèvre et le porc.

La mortalité s'observe chez les nouveau-nés et les veaux sélectionnés, mais elle provoque des dégâts économiques, surtout pendant la saison des labours et au moment de la récolte.

Le tableau ci-dessous montre la répartition des foyers de la maladie au cours des trois dernières années.

(1) *Bull. Off. Int. Epiz. t.* 57, 1962, p: 620.

PROVINCE	FOYERS 1959	FOYERS 1960	FOYERS 1961
Téhéran	44	53	26
Guilan	6	3	7
Mazandaran	3	14	1
Azarbayedjan (Est)	15	146	73
Azarbayedjan (Ouest)	76	50	105
Kermanschah	34	8	21
Khousestan	33	—	—
Farse	388	94	4
Kerman	33	25	23
Khorassan	38	80	2
Isphahan	19	34	5
Régions centrales	155	46	45
Baloutchestan	6	1	5
Kurdistan	29	21	—
TOTAL	879	575	317

Types du virus rencontrés en Iran.

Au cours de ces trois dernières années, 125 prélèvements ont été envoyés à l'Institut Razi et le résultat de l'identification des types a été le suivant:

Type A	46 cas	36,8 %
Type O	29 cas	23,2 %
Type A et O	1 cas	0,8 %
Négatif	49 cas	39,2 %

Certains de ces prélèvements, envoyés au Laboratoire Mondial de Référence de Pirbright (Grande-Bretagne) en vue de la confirmation du diagnostic, ont fourni les résultats suivants:

Type A	22 cas	44,0 %
Type O	18 cas	36,0 %
Négatif	10 cas	20,0 %

Le type Asia I a été isolé une seule fois en 1957 d'une étable des environs de Téhéran.

Méthode de la préparation du vaccin.

La préparation du vaccin contre la fièvre aphteuse a commencé en Iran dès 1960. Par suite de l'éloignement de l'Institut des abattoirs et des difficultés pour obtenir de l'épithélium lingual, en vue de la production de virus par la méthode de Frenkel, nous avons employé des cellules rénales de mouton qui nous ont paru plus pratiques dans nos conditions de travail.

Technique.

On récolte aseptiquement les reins sur des moutons sains, âgés d'un an et on sépare immédiatement la partie corticale en y ajoutant un peu de P.B.S. (Phosphate Buffer Saline).

Suivant la technique générale, on coupe finement le tissu avec des ciseaux et on le trypsinise préalablement pendant 15-20 minutes avec une solution de trypsine à 0,25 p. 100 titrant 1: 250 dans le P.B.S.

Après la trypsinisation préalable, le liquide surnageant est décanté et on ajoute la solution de trypsine au culot résiduel. On laisse une nuit, à une température de + 4° C, sur l'agitateur magnétique. Le lendemain, on lave les cellules avec le P.B.S. en les centrifugeant trois fois à 800 T.P.M. La dernière centrifugation se fait dans des tubes gradués afin de déterminer le volume occupé par les cellules.

De chacun des reins, on obtient 15 ml de cellules.

Le milieu de culture est constitué par une solution de Hanks avec 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, 0,05 p. 100 d'extrait de levure et 10 p. 100 de sérum de poulain (on ne peut pas utiliser le sérum de veau par suite de l'existence possible d'anticorps anti-aphteux).

La culture se fait dans des boîtes de Roux et chaque boîte contient 65 à 75 ml de suspension cellulaire à 0,2 - 0,3 p. 100.

On remplace le milieu de culture au bout de 3 jours par un milieu nouveau, contenant 5 p. 100 de sérum de poulain.

Sept jours après le changement de milieu de culture, les cellules atteignent 100 p. 100 de leur développement et sont prêtes pour l'infection. Le virus montre son effet cytopathogène 14 à 16 heures après l'infection des cultures.

On vérifie la stérilité microbiologique de la culture de virus et on titre

le virus, par le procédé de Reed et Muench, en l'injectant à des souriceaux non-sevrés ou bien à des cellules en culture.

Le titre obtenu pour le type O se situe entre $10^{-6.7}$ $10^{-7.2}$ et pour le type A, il est un peu inférieur à celui du premier.

Etant donné que le transport et la conservation du vaccin à + 4° C ne peuvent être assurés partout, on ajoute 10 p. 100 de glycérine au vaccin aluminé en vue de conserver sa durée d'efficacité à la température ordinaire, jusqu'au moment de son emploi.

La composition de notre vaccin anti-aphtheux bivalent A et O pour 500 litres est:

Gel d'alumine	250 litres
Tampon au glyocolle	5 litres
Virus - Type A	20-30 litres (suivant le titre)
Virus - Type O	20-30 litres (suivant le titre)
Eau formolée	5 litres
Glycérine	50 litres
Eau distillée	150-130 litres

L'inactivation du vaccin se fait à 25° C durant 36 à 48 heures.

Contrôle du vaccin.

Après la distribution du vaccin dans des flacons de 1.000 ml, on lui fait subir des contrôles de stérilité, d'innocuité et d'efficacité.

Pour s'assurer de la stérilité du vaccin, nous l'ensemencions dans des milieux de culture usuels et nous l'injectons également par voie intramusculaire à deux cobayes et à deux lapins.

Pour l'épreuve de l'innocuité, nous injectons 1/10 ml de vaccin en 20 points différents de la muqueuse linguale et 10 ml par voie sous-cutanée à un veau réceptif qu'on observe pendant quelques jours.

Du point de vue de l'efficacité, on injecte une dose de 20 ml de vaccin par voie sous-cutanée à 12 veaux. Après 4 semaines, les veaux vaccinés sont répartis en deux groupes. Chaque groupe est éprouvé séparément avec 10,000 ID 50 des virus O ou A, en gardant comme témoins deux veaux réceptifs pour chaque groupe.

Les animaux témoins montrent, après l'injection du virus, une généralisation, mais les veaux vaccinés résistent sans montrer de symptômes de la maladie.

Le sérum des veaux utilisés est examiné, avant et après l'injection, par la méthode de séro-neutralisation pour détecter les anticorps spécifiques de la fièvre aphteuse.

Outre le contrôle du vaccin par la méthode sus-mentionnée, le vaccin préparé à notre Institut est aussi injecté au cobaye selon la méthode d'Ubertini.

Au cours des années 1960-1961, on a préparé huit lots de vaccin d'un total de 200.000 doses qui ont été employées avec succès dans les diverses régions du pays pour la prévention de la fièvre aphteuse.

Ce vaccin est efficace, tant au cours des expériences de laboratoires qu'en dehors de l'Institut.

CONCLUSION

Nous avons utilisé avec succès la culture cellulaire de reins de moutons pour la production du virus aphteux à une échelle industrielle.

L'addition de glycérine au vaccin donne la possibilité de le conserver et de le transporter à une température de plus de + 4° C ainsi que cela a été démontré avant nous.

Le vaccin préparé à l'Institut Razi est inoffensif et efficace.

CONCLUSION

We have used, successfully, sheep kidney cell culture in the production of Foot-and-Mouth Disease virus on a commercial scale.

The addition of glycerine enables the vaccine to be preserved and transported at a temperature of over + 4° C — a finding that has been observed before we noted it.

Vaccine prepared at the Razi Institute is innocuous and potent.

BIBLIOGRAPHIE

- DULBECCO (R.) and VOGT (M.). — Plaque formation and utilisation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. exp. Med.*, 1953, **99**, 167.
- FRENKEL (H.S.). — Research on Foot-and-Mouth Disease. I - The cultivation of the virus in explantations of tongue epithelium of bovine animals. *Amer. J. vet. Res.*, 1950, **11**, 371.
- MOOSBRUGGER (G. A.). — Observations sur l'effet de l'adjonction de glycérine au vaccin anti-aphteux. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1951, **35**, 595.

- PETERMANN (H. G.). — La culture des cellules épithéliales et son application possible à l'étude du virus aphteux. *Congr. Arg. Fiebre aftosa*, Buenos Aires, 1957, 14-16 mai 1957, 89-93.
- RAFYI (A.) et RAMYAR (H.). — Etat actuel de la fièvre aphteuse en Iran. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1959, **53**, 38.
- RAFYI (A.). — Epizootologie et prophylaxie de la fièvre aphteuse au Moyen-Orient. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1960, **54**, 35.
- REED (L. J.) and MUENCH (H.). — A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- SELLERS (R. F.), BURT (L. M.), CUMMING (A.) and STEWART (D. L.). — The Behaviour of strains of the virus of Foot-and-Mouth Disease in pig, calf and lamb tissue cultures. *Arch Virusforsch.*, 1959, **9**, n° 3.
- UBERTINI (B.), NARDELLI (L.), DAL PRATO (A.), PANINA (G.) et SANTERO (G.). — La détermination quantitative des anticorps neutralisants et le titrage de l'antigène contenu dans le vaccin anti-aphteux. — *Bull. Off. int. Epiz.*, 1960, **53**, 1307.
- YOUNGNER (J. S.). — Monolayer tissue cultures. I - Preparation and standardization of suspensions of trypsin—dispersed monkey kidney cells.— *proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **85**, 202.