

IMMUNISATION ANTICLAVELEUSE

METHODE ACTUELLE DE PRODUCTION DU VACCIN CLAVELEUX A L'INSTITUT D'ETAT DES SERUMS ET VACCINS RAZI, IRAN(*)

H. RAMYAR

INTRODUCTION

La clavelée, maladie spécifique du mouton, est une affection contagieuse qui sévit à l'état enzootique avec des poussées épizootiques en Asie et en de nombreuses régions du continent Africain.

Au Moyen-Orient, où l'élevage des ovins a une grande importance, tout particulièrement pour les nomades dont il est le plus souvent la seule ressource, les épizooties claveleuses provoquent des dégâts considérables.

L'importante mortalité et les pertes économiques liées à cette maladie font que depuis une époque reculée, divers procédés prophylactiques ont été mis en oeuvre.

Le but de ce rapport est de rappeler brièvement les méthodes de prophylaxie utilisées jusqu'à présent et de rapporter les résultats de nos travaux de production industrielle, d'un virus vaccin modifié, propagé sur cultures cellulaires.

LES METHODES PROPHYLACTIQUES

La Clavelisation

C'est le plus ancien procédé utilisé par les bergers pour protéger les moutons contre la clavelée.

Le liquide vésiculaire et les croûtes récoltés sur les animaux atteints sont dilués et inoculés à l'oreille ou sous la queue des animaux à vacciner.

Cette méthode préliminaire, outre qu'elle produit des réactions graves,

(*) Symposium Méditerranéen sur les maladies Infectieuses du mouton. Ile de RHODES
12-15 Octobre 1970

souvent accompagnées de généralisation, provoque des pertes qui ne sont pas inférieures à celles dues à l'infection naturelle.

Virus dilué

Dans le double but d'éviter les réactions violentes et la généralisation, et d'épargner le virus, on dilue en eau physiologique le claveau obtenu à partir d'animaux inoculés.

Pour déterminer la dilution la plus inoffensive et la plus efficace du virus, on prépare différentes dilutions dont 0,5 ml de chacune est inoculé par la voie intradermique à des moutons sensibles. La dilution de virus qui provoque une réaction locale avec formation d'un nodule sera choisie pour la vaccination.

En général, les moutons inoculés avec ce virus présentent des réactions assez sévères accompagnées de fièvre.

Delpy et Rafyi (26) ont dilué le virus claveleux au 1/200 en eau physiologique et en ont employé 0,2 ml pour immuniser des moutons par une inoculation sous la queue.

La validité de vaccin est alors de courte durée et on a constaté l'apparition d'épizooties à la suite de l'utilisation de ce virus.

Virus affaibli par des agents physiques ou les produits chimiques

Les expériences de Duclert et Conte cités par Muzzaffar (51) montrent que l'inoculation du virus claveleux conservé à une température de 25° C. pendant 9 à 23 jours ne provoque pas de généralisation chez les moutons.

Jesic (39) et Mitscherlich (49) ont utilisé la dilution au 1/5 du virus dans une solution de 3% d'acide borique. Angeloff et all. (1) ont constaté que la solution à 2% de phénol, d'acide chlorhydrique et d'acide sulfurique inactive le virus auquel on a ajouté du vert brillant après 5 minutes.

Un antigène glycérimé (à parties égales) et chauffé une demi-heure à 60°C. a été utilisé par Donatien et Lestoquard (31).

Ducloux et Cordier (33) et Jezic (40) ont étudié l'effet de l'aldehyde formique, de l'éthanol et du buthanol sur le virus claveleux. D'après ces auteurs, l'inoculation de 0,5ml du virus formolé à 1,25 pour 1.000 ne produit pas de réaction. Forgéot et Mavridis (31) ont observé que le claveau dilué, formolé à 0,1%, protège les moutons contre la maladie quand il est injecté deux fois sous un volume de 0,25ml et 0,5 ml.

En Iran. Delpy et all. (29) ont employé le virus formolé pour immuniser les moutons les plus sensibles des Côtes Caspiennes.

Ramazotti (58), Celiker et Arik (18) et Velu & Zottner (68) ont ajouté de la saponine à une émulsion du virus claveleux et ont constaté que la saponine

n'altère pas l'antigénicité du virus puisque les moutons inoculés avec le virus saponiné acquièrent une immunité durant 7 mois.

Virus vaccinal

Kasai (43) et Gins & Kunert (36) ont réussi l'immunisation de moutons avec le virus vaccinal. Ces auteurs pensent que les animaux vaccinés avec le virus ovinisé résistent à l'inoculation du virus claveleux virulent.

Virus caprinisé

Kasai (44) et Ilhami & all (38) ont mis au point la production d'une grande quantité de l'antigène claveleux sur la chèvre.

On injecte à la chèvre le virus claveleux par la voie intradermique ou sous-cutanée, selon la méthode de Borrel. A la suite des passages successifs la virulence du virus augmente graduellement pour la chèvre.

Le virus caprinisé peut être utilisé pour la vaccination entre le 10^{ème} et le 15^{ème} passage. Ce virus nommé caprina ou ovicap a été utilisé avec de bons résultats dans certains pays où la clavelée existe, mais rien n'a été rapporté à ce jour en ce qui concerne son efficacité et la durée de l'immunité qu'il confère.

Rafyi et Ramyar (57) ont vacciné les moutons avec le virus variolique de la chèvre. Les animaux ainsi vaccinés et quelques animaux témoins sont alors éprouvés avec le virus claveleux; seuls les témoins ont présenté des réactions spécifiques de la clavelée. D'après Munro (50) le virus hétérologue ne confère pas une immunité aussi solide que celle conférée par le virus homologue.

Virus lapinisé

Kasai (42) a injecté le virus claveleux par voie testiculaire à des lapins et a pu réaliser des passages successifs chez cet animal. Il a montré que le virus lapinisé est différent du virus original. Müzzaffar (51) rapporte que les moutons inoculés avec le virus lapinisé s'immunisent sans présenter des réactions graves.

Virus avianisé

Rao (62), Balozet (5) et Gerlach (35) ont réussi la culture du virus claveleux sur la membrane chorio-allantoïdienne des embryons de poulet. Sabban (65), avec la souche virulente du virus égyptien, a fait 21 passages alternatifs sur mouton et embryon de poulet. Le virus ayant un titre de 10^{-5} - 10^{-6} a été utilisé pour la vaccination des moutons.

Borisovich et all. (8) ont utilisé avec de bons résultats la souche avianisée K et ont trouvé que cette souche protège les moutons pour une durée de 5 mois.

Gins et Kunert (36) ont constaté que le virus avianisé perd sa virulence ainsi que son pouvoir antigénique si le nombre de passages est trop élevé.

Virus naturellement avirulent

Sabban (64) rapporte qu'une souche de virus claveleux reçue d'Iran, provoque une réaction locale de la grosseur d'un pois quand elle est inoculée aux moutons égyptiens. Cette souche a été lyophilisée au 5ème passage et conservée à -20°C. La dilution au 1/100 de ce virus a été utilisée pour l'immunisation des moutons indigènes.

Baskaya et all. (6) ont obtenu de bons résultats en utilisant cette souche pour contrôler la maladie en Turquie.

Sur le plan de la prophylaxie, ce vaccin n'a pas beaucoup de valeur car l'antigénicité de la souche ne peut être conservée uniformément pendant longtemps.

Sérothérapie et Séro-clavelisation

En 1896 Duclert a constaté que le sérum des moutons guéris de la clavelée a une propriété thérapeutique et prophylactique. Borrel (9) a montré que l'administration de 20 à 30 ml de sérum anti-claveleux, 24 heures avant l'inoculation du virus virulent, empêche les réactions graves et la généralisation.

Kolayli et Mavridis (15). en utilisant 0,25 ml d'un mélange de virus et de sérum "Claveau Séruminisé" ont mis en évidence une immunité de 6 mois chez les moutons, sans provoquer l'apparition d'une pustule.

Virus sensibilisé

Bridré et Boquet (13, 14 & 15), Bridré et Martin (16), Blanc et Martin (7) et d'Arces & Zavagli (25) ont mis en pratique le virus sensibilisé. Les animaux vaccinés montrent des réactions locales et thermiques légères et l'immunité est assurée dès 48 heures pour une durée d'un an.

Bacharan et all. (3) en Turquie. Jesic (41) et Tripkovic (67) en Yougoslavie ont fait l'usage du virus sensibilisé pour combattre la maladie.

Ribeiro et Sureau (63) rapportent que le vaccin anticlaveleux lyophilisé, préparé à partir de virus sensibilisé, se conserve 7 mois à la température de 20 -25° C. et la durée de l'immunité conférée par ce vaccin dépasse un an.

Vaccins associés

Dubois et all, (32) ont réussi l'immunisation de moutons contre la clavelée et la brucellose. Cordier (24), Placidi et all. (54) et Delpy (30) ont montré la

possibilité de l'immunisation des moutons contre la fièvre aphteuse et la clavelée en un seul temps, en mélangeant les deux vaccins. Delpy et all. (27 & 28) ont préparé un vaccin lyophilisé contre la clavelée et le charbon bactérien. L'application sur le terrain de ce vaccin a été rendue désastreuse par la virulence du virus claveleux présent dans le mélange.

Likhachev et all. (47) montrent que le vaccin mixte préparé avec des souches avianisées du virus claveleux et des souches avirulentes de *Bacillus anthracis* confère une immunité de 3 à 4 mois pour la clavelée et de 7 1/2 mois pour le charbon bactérien.

Ramyar et Baharsefat (61) ont réalisé un vaccin mixte contre la clavelée et le charbon en mélangeant une quantité déterminée de virus claveleux atténué et des spores d'une souche avirulente de *B. anthracis*.

Virus vaccins adsorbés sur gel d'alumine.

Balozet (4). Bots (10). Wynohradnyk et Cristet (71), Pandey et all. (53) et Celiker & Arik (17) ont montré que le virus adsorbé sur gel d'alumine protège les moutons contre la clavelée sans provoquer des réactions violentes.

Rafyi et Mirshamsy (56) rapportent qu'une dose de vaccin adsorbé contenant 100 D. R. (dose réactionnelle) du virus claveleux immunise les moutons pendant un an.

Manninger (48) et Delpy & Rafyi (29) ont inactivé le virus adsorbé par le formol et ont constaté que cet anavirus est complètement inoffensif et anti-génique pour les races de moutons hautement sensibles.

Les expériences de Vigario (69) montrent que les vaccins adsorbés doivent être riches en antigène virulent. En Iran nous avons trouvé que le virus claveleux adsorbé inactivé par le formol ne confère pas une immunité satisfaisante quand le rapport du virus au gel est inférieur au 1/20.

Virus vaccins à base de cultures cellulaires

Bridré (12) paraît être le premier à avoir réussi à cultiver le virus claveleux sur des fragments de tissus testiculaires ovins en suspension dans le liquide de Drew.

Aygün (2) rapporte que le virus claveleux cultivé sur les tissus pulmonaires et cutanés de foetus ovin n'est plus virulent pour le mouton après 12 passages successifs.

Boué et all. (11) ont cultivé le virus sur les tissus cutanés et sur la rate de l'embryon ovin.

Coackley et Capstick (23), Vigario (70), Hess et all. (37), Lang et Iefthé-

riosis (46) et Nitzschke et al. (52) rapportent la propagation du virus sur des cultures de cellules testiculaires et thyroïdes ovines.

Plowright & Ferris (55) et Cilli & Baldelli (19,20,21 & 22) ont effectué des cultures de virus claveleux sur des tissus testiculaires d'agneau et ont étudié avec précision les caractéristiques du virus de culture.

A la suite des expériences de Plowright et Ferris d'une part et des travaux intéressants de Cilli et Baldelli d'autre part, Ramyar (59) et Ramyar & Hessami (60) ont pu atténuer une souche de virus claveleux par passages successifs sur des cellules rénales de mouton et ont réussi à produire à l'échelle industrielle le virus vaccin vivant contre la clavelée.

Application massive d'un vaccin claveleux à virus atténué sur cultures cellulaires en Iran

En Iran, parmi les maladies contagieuses du mouton, la clavelée est la plus importante par le nombre des épizooties, le taux de mortalité élevé et les pertes économiques graves qu'elle occasionne.

Pour contrôler la maladie, la vaccination en masse est la méthode de choix. Dès 1930, différentes sortes de vaccins anticlaveleux ont été préparées à l'Institut d'Etat Razi (26.27.28.29. & 56) mais en plus des difficultés de production, les tests d'innocuité et d'efficacité de ces produits n'ont pas toujours donné des résultats satisfaisants.

Les résultats contradictoires obtenus sur le terrain, à la suite de l'utilisation de ces vaccins d'une part, et la complexité pour obtenir du virus par inoculation à des moutons d'autre part, nous ont incité, depuis 1963, à tenter l'adaptation du virus claveleux en cultures cellulaires et obtenir une souche modifiée par passages successifs sur des explants de rein ovin.

La production du virus sur cultures cellulaires est simple et moins onéreuse. Le titre et le pouvoir immunogène du virus de culture ne sont pas inférieurs à ceux des virus obtenus par la technique de pustule de Borrel ou de l'oeuf embryonné. Le virus de culture est libre de toutes les contaminations accidentelles qui peuvent poser de graves problèmes au cours de la lutte contre la maladie.

MATERIELS ET METHODES

C e l l u l e s : On obtient des couches monocellulaires de cellules de rein d'agneau, âgé de 1 à 3 mois, par les procédés classiques. Ces cultures sont infec-

tées avec une dilution au 1/100 de la souche modifiée du virus. On utilise le milieu VM3 comme milieu de maintenance (66). Ce milieu manque de phosphate et de sérum et permet des congélations et décongélations successives du matériel viral, sans diminution remarquable du titre.

Les cellules infectées présentent un effet cytopathogène (ECP) léger dès 48 heures après l'inoculation et qui devient total en 96-120 heures.

V i r u s : Une souche de virus claveleux désignée par nous RM/65 a été adaptée et passée 80 fois sur les cultures primaires de cellules rénales ovines.

Les passages primaires de virus de culture inoculé à des moutons provoquent des réactions locales assez sévères avec hypothermie atteignant 41°5 C, suivies de généralisation pour environ 10% des animaux inoculés.

Après 30 passages successifs, nous avons trouvé que le virus n'est plus pathogène pour le mouton, mais il a gardé l'antigénicité complète pour conférer une immunité solide de longue durée.

PREPARATION ET UTILISATION DU VACCIN

Quand l'effet cytopathogène des cultures est total, ce qui est réalisé en 96 - 120 heures, les flacons sont transférés dans un congélateur à - 30° C. Après 24 heures, le matériel est décongelé à la température du laboratoire, recueilli dans des ballons de 18 litres préalablement stérilisés, puis distribué dans des flacons de 5 ml à raison de 2 ml par flacon et lyophilisé dans des appareils de Stokes à - 40° C. sous un vide de 50 microns.

Le virus doit être titré avant et après la lyophilisation sur des cellules rénales d'agneau et par inoculation à des moutons sensibles. On effectue des tests de stérilité, d'innocuité et d'efficacité pour chaque lot de produit.

On reconstitue le contenu de chaque flacon de vaccin dans 100 ml de solvant (eau distillée stérile) et on injecte par la voie sous-cutanée 0,5 ml, ce qui représente une dose vaccinale contenant 100 DICT50.

Les réactions vaccinales sont faibles. Les brebis gestantes n'avortent pas et la transmission de l'infection entre ovins par cohabitation n'est jamais constatée.

La durée de l'immunité conférée par ce vaccin a été expérimentée à plusieurs reprises. Les résultats de nos expériences au laboratoire montrent que 98.8% des moutons résistent à l'épreuve virulente 2 ans après la vaccination. Aussi selon les rapports des vétérinaires praticiens, la clavelée n'est pas apparue dans les troupeaux vaccinés depuis plus de 2 ans.

Le vaccin lyophilisé garde son antigénicité 20 jours à 37° C., plus de 2 mois à la température de laboratoire (21 - 26° C.) et plus d'un an dans une chambre froide à + 4°C.

Depuis 1966 plus de 57. 051.000 doses de virus vaccin modifié ont été utilisées avec de bons résultats, ce qui a permis de juguler la maladie en Iran.

BIBLIOGRAPHIE

1. – Angeloff, S., Parapotoff, P., Manolowa, N. & Nikoloff, P. (1956)
Arch. exp. Vet. Med. **10**, 365.
2. – Aygün, S.T. (1955)
Arch. exp. Vet. Med. **9**, 415.
3. – Bacharan. M., Mavrioglu, N., Ichildar, B. & Unel, S. (1952)
Bull. Off. Intern. Epiz. **37**. 50
4. – Balozet, L. (1938)
C.R. Acad. Sci. **207**, 349.
5. – Balozet. L. (1942)
Arch. Inst. Pasteur Tunis **31**, 290.
6. – Baskaya. H., Gürtürk, S. & Arda, M. (1956).
Turk Vet. Hek. Dern. Derg. **26**. 3109.
7. – Blanc. G. & Martin, L.A. (1937)
Arch. Inst. Pasteur Maroc **1**. 721.
8. – Borisovich. Yu. F., Koval, G., Bagmet, L.G. & Pal'gov, A.A (1966)
Vet. Bull. **37**, 1646.
9. – Borrel, A. (1903)
Ann. Inst. Pasteur **17**. 732.
10. – Bots, J.J. (1942)
Vet. Bull. **18**, 457.
11. – Boué. A., Baltazard, M. & Vieuchange, J. (1957)
C.R. Acad. Sci. **244**, 1571.
12. – Bridré. J. (1935)
C.R. Soc. Biol. **119**. 502.
13. – Bridré, J. & Boquet, A. (1913)
Ann. Inst. Pasteur **27**, 797.
14. – Bridré, J. & Boquet, A. (1923)
Ann. Inst. Pasteur **37**, 229.
15. – Bridré, J. & Boquet, A. (1933)
Ann. Inst. Pasteur **51**, 761.
16. – Bridré, J. & Martin, L.A. (1939)
Bull. Acad. Vet. Fr. **12**, 291.

17. - Celiker, A. & Arik, F. (1962)
Brit. Vet. J. **118**, 159.
18. -- Celiker, A. & Arik, F. (1967)
Pendik Vet. Kont. & Aras. Enst. Derg. **1**, 35
19. - Cilli, V. & Baldelli, B. (1957)
Boll. Ist. Sieroter. Milan **36**, 611.
20. - Cilli, V. & Baldelli, B. (1957)
Boll. Ist. Sieroter. Milan **36**, 621.
21. - Cilli, V. & Baldelli, B. (1958)
Lo Sperimentale **108**, 91.
22. - Cilli, V. (1961)
Rec. Med. Vet. **137**, 663.
23. - Coackley, W. & Capstick, P.B. (1961)
Res. Vet. Sci. **2**, 369.
24. - Cordier, G. (1940)
Rec. Med. Vet **116**, 254.
25. - D'Arces, P. & Zavagli, P. (1951)
Bull. Off. Intern. Epiz. **35**, 184.
26. - Delpy, L.P. & Rafyi, A. (1947)
Bull. Acad. Vet. Fr. **20**, 347.
27. - Delpy, L.P. & Mir Chamsy, H. (1947).
C.R. Acad. Sci. **225**, 158.
28. - Delpy, L.P., Rafyi, A. & Mir Chamsy, H. (1951)
Bull. Acad. Vet. Fr. **24**, 50.
29. - Delpy, L.P., Rafyi, A. & Mir Chamsy, H. (1951)
Bull. Acad. Vet. Fr. **24**, 56.
30. - Delpy, L.P. (1959)
Bull. Acad. Vet. Fr. **32**, 69.
31. - Donatien, A. & Lestoquard, F. (1933)
C.R. Soc. Biol. **112**, 573.
32. - Dubois, J.M., Bataillé, G. & Canaby (1935)
Rev. Gen. Med. Vet. **44**, 653.
33. - Ducloux, E. & Cordier, G. (1926).
C.R. Acad. Sci. **183**, 486.
34. - Forgéot, P. & Mavridis, N. (1930).
Bull. Acad. Vet. Fr. **3**, 130.
35. - Gerlach, Fr. (1953)
Turk. Vet. Hek. Dern. Derg. **23**, 1038.

36. – Gins, H.A. & Kunert, H. (1937)
Vet. Bull. **8**, 222.
37. – Hess, W.R., May, H.J. & Patty, R.E. (1963)
Am. J. Vet. Res. **24**, 59.
38. – Ilhami, O. Mükerrrem, G. & Avni, U. (1958)
Turk. Vet. Hek. Dern. Derg. **28**, 4.
39. – Jezic, J.A. (1932)
Vet. Bull. **3**, 622.
40. – Jezic, J.A. (1934)
Bull. Inst. Pasteur **32**, 303.
41. – Jezic, J.A. (1937)
Vet. Bull. **8**, 30.
42. – Kasai, H. (1931)
Jap. J. Exp. Med. **9**, 281.
43. – Kasai, H. (1931)
Jap. J. Exp. Med. **9**, 299.
44. – Kasai, H. (1931)
Jap. J. Exp. Med. **9**, 315.
45. – Kolayli, S. & Mavridis, N. (1934)
Rec. Med. Vet. **110**, 669.
46. – Lang, R. & Lefthériotis, E. (1961)
Bull. Acad. Vet. Fr. **34**, 337.
47. – Likhachev, N.V. Kolesov, S.G., Borisovich, Yu. F. & Presnov, I.N. (1967)
Vet. Bull. **38**, 3009.
48. – Manninger, R. (1948)
Bull. Off. Intern. Epiz. **29**, 237.
49. – Mitscherlich, E. (1949)
Vet. Bull. **20**, 1628.
50. – Munro, D.A. (1947)
Indian J. Vet. Sci. **17**, 193.
51. – Müzaffar, U. (1956)
Turk Vet. Hek. Dern. Derg. **26**, 3068.
52. – Nitzschke, E., Buckley, L.S. & Ergin, H. (1967)
Vet. Rec. **81**, 216.
53. – Pandey, A.K., Malik, B.S. & Bansal, M.P. (1961)
Indian Vet. J. **46**, 1017.
54. – Placidi, L., Santucci, J., Haag, J. & Sendral, R. (1958)
Bull. Acad. Vet. Fr. **31**, 351.

55. – Plowright, W. & Ferris, R.D. (1958)
Brit. J. Exp. Path. **39**, 424.
56. – Rafyi, A. & Mirchamsy, H. (1956)
Brit. Vet. J. **112**, 541.
57. – Rafyi, A. & Ramyar, H. (1959)
J. Comp. Path. **69**, 141.
58. – Ramazzotti, G. (1933)
Vet. Bull. **4**, 355.
59. – Ramyar, H. (1965)
Zbl. Vet. Med. B. **12**, 537.
60. – Ramyar, H. & Hessami, M. (1967)
Zbl. Vet. Med. B. **14**, 516.
61. – Ramyar, H. & Baharsefat, M. (1969)
Zbl. Vet. Med. B. **16**, 588.
62. – Rao, R.S. (1938)
Indian J. Med. Res. **26**, 497.
63. – Ribeiro, M. & Sureau, P. (1967)
Arch. Inst. Pasteur Algérie **45**, 11.
64. – Sabban, M.S. (1955)
Am. J. Vet. Res. **16**, 209.
65. – Sabban, M.S. (1957)
Am. J. Vet. Res. **18**, 618.
66. – Schwöbel, W. & Siedentopf (1961)
Zbl. Bakt. I Orig. **181**, 3.
67. – Tripkovic (1936)
Vet. Bull. **7**, 179.
68. – Velu, H. & Zottner, G. (1933)
C.R. Soc. Biol. **113**, 571.
69. – Vigario, J.J. (1965)
Vet. Bull. **37**, 880.
70. – Vigario, J.J. (1965)
Vet. Bull. **37**, 881.
71. – Wynohradnyk, V. & Cristet, I. (1956)
Vet. Bull. **27**, 73.