COMMISSION EUROPÉENNE DE LUTTE CONTRE LA FIÈVRE APHTEUSE

RAPPORT DE LA RÉUNION
du
GROUPE DE RECHERCHE DU COMITÉ TECHNIQUE PERMANENT
tenue au
ANIMAL VIRUS RESEARCH INSTITUTE

Pirbright, Angleterre
14-16 septembre 1966

ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE
Rome, 1967

COMMISSION EUROPEENNE DE LUTTE CONTRE LA FIEVRE APHTEUSE

RAPPORT DE LA REUNION

DU

GROUPE DE RECHERCHE DU COMITE TECHNIQUE PERMANENT

tenue au

Animal Virus Research Institute

Pirbright, Angleterre

14 - 16 septembre 1966

ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE
Rome, 1967

TABLE DES MATIERES

Page

RAPPORT DE LA REUNION .....

INTRODUCTION 1

SEANCES PLENIERES 1

1. Innocuité et efficacité des vaccins inactivés 1

2. Production de vaccin antiaphteux sur cultures cellulaires.. 2

3. Epizootologie..... 4

4. Structure du virus aphteux 6

5. Immunisation du porc..... 6

6. Immunisation du mouton 8

VISITE DES PARTICIPANTS AU LABORATOIRE 8

REUNION DU GROUPE DE RECHERCHE 9

ANNEXE I

Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux inactivé monovalent et trivalent sur cobayes, étude de la loi dose-effet et équivalence entre les doses vaccinantes 50 pour cent chez les cobayes et le pourcentage de protection chez les bovins - par J. Terre, C. Stellman, P. Bornarel, M. Roumiantzeff, H. Favre, J. Fontaine et C. Mackowiak..... 11

ANNEXE II

Rapport préliminaire sur l'emploi de lapins pour essayer les vaccins antiaphteux inactivés - par R.H. Fagg..... 38

ANNEXE III

Bilan d'une campagne de contrôle officiel de vaccins antiaphteux au Laboratoire central de recherches vétérinaires d'Alfort - par Léone Dhennin, G. Gayot et Louis Dhennin.... 50

ANNEXE IV

Note sur les cultures de cellules BHK 21 pour la production à grande échelle de virus aphteux - par B. Ubertini, L. Nardelli, A. Del Prato, G. Panini et S. Barei 54

ANNEXE V

Vaccin antiaphteux concentré préparé à partir de cultures cellulaires - par H.C. Girard, M. Sütcü, M. Sentürk, G. Okay, M. Oral, A.D. Yongu, O.S. Bayramoglu, N. Unlüleblebici et C. Boz 65

ANNEXE VI — Page

Culture du virus aphteux en suspension cellulaire stationnaire et étude de son pouvoir immunogène - par F. Lucam, G. Dannacher et M. Fedida 94

ANNEXE VII

Production de vaccin antiaphteux sur cellules BHK 21 - par P.B. Capstick et R.C. Telling 106

ANNEXE VIII

Les variations de type du virus aphteux en cours d'épizootie - par le Dr G.A. Moosbrugger 111

ANNEXE IX

Sous-types de virus aphteux, situation actuelle - par J. Davie 119

ANNEXE X

Variantes immunologiques du virus aphteux - par F. Lucam, M. Fedida, G. Dannacher et J. Perraud 126

ANNEXE XI

Etudes sur le terrain de la fièvre aphteuse au Bétchouanaland - par R.S. Hedger 131

ANNEXE XII

Observations sur l'état de porteur de virus après contact avec le virus aphteux - par R. Burrows 139

ANNEXE XIII

La structure du virus aphteux : revue de l'état actuel des connaissances - par F. Brown 150

ANNEXE XIV

Mise en évidence d'un troisième composant antigénique de la fièvre aphteuse - par K.M. Cowan et J.H. Graves 153

ANNEXE XV

Expérience acquise aux Pays-Bas sur la vaccination des porcins contre la fièvre aphteuse - par J.G. van Bekkum et P.H Bool..... 164

ANNEXE XVI

La fièvre aphteuse chez le porc. I. La réponse immunitaire du porc au virus aphteux traité ou non par des produits chimiques - par P.D. McKercher et A.R. Giordano 169

ANNEXE XVII

Que peut-on attendre de la vaccination antiaphteuse du porc ? - par F. Lucam, M. Fedida, G. Dannacher et J. Perraud ..... Page 186

ANNEXE XVIII

Notes sur les résultats d'expérimentations utilisant des vaccins à base de virus aphteux inactivé chez les porcs - par R. Burrows..... 201

ANNEXE XIX

Vaccination antiaphteuse du mouton - par J. Fontaine, P. Bornarel, C. Dubouclard, C. Stellman et R. Lang 208

COMMISSION EUROPEENNE DE LUTTE CONTRE LA FIEVRE APHTEUSE

REUNION DU GROUPE DE RECHERCHE DU COMITE TECHNIQUE PERMANENT

tenue au Virus Research Institute,
à Pirbright, du 14 au 16 septembre 1966

INTRODUCTION

A la suite de la décision prise au cours d'une réunion des membres du Groupe de recherche du Comité technique permanent à Lyon en 1965, une réunion a été tenue à l'Animal Virus Research Institute, Pirbright, Grande-Bretagne, du 14 au 16 septembre 1966. La réunion a été organisée et présidée par le Dr J.B. Brooksby, Directeur de l'Animal Virus Research Institute.

L'Ordre du jour suivant a été approuvé :

1. Innocuité et efficacité des vaccins inactivés
2. Production de vaccin à partir de cultures cellulaires
3. Epizootologie
4. Structure du virus aphteux
5. Immunisation du porc
6. Immunisation du mouton

Une grande partie de la réunion a été consacrée à des démonstrations de laboratoire et à la discussion du travail de recherche actuellement en cours dans les différentes sections de l'Institut. Outre les membres du Groupe de recherche (Dr. J.B. Brooksby, Prof. R. Willems, Prof. B. Ubertini, Dr. E. Michelsen et Dr J.G. van Bekkum), étaient présents le Dr G.A. Moosbrugger, Secrétaire général de la Commission permanente de l'OIE pour la fièvre aphteuse, la plupart des chercheurs de l'Animal Virus Research Institute, les représentants des laboratoires nationaux de Belgique, France, Grèce, Turquie et Etats-Unis, une délégation des laboratoires de l'IFFA, ainsi que quelques observateurs. Le Secrétariat de la réunion était formé du Dr G.M. Boldrini, de Sir Thomas Dalling et de Mademoiselle D. Guarino.

Vingt documents ont été discutés au cours de la réunion.

SEANCES PLENIERES

1. Innocuité et efficacité des vaccins inactivés

Le Dr Mackowiak (IFFA) a présenté un rapport sur le contrôle quantitatif chez les cobayes des vaccins aphteux inactivés monovalents et trivalents. Ce document complète la série de rapports sur ce sujet : les rapports précédents avaient été présentés au cours des réunions du Groupe de recherche à Amsterdam en 1964 et à Lyon en 1965. La Commission avait chargé le Groupe de recherche de traiter ce point en vue d'évaluer la possibilité d'utiliser des cobayes dans les épreuves normales d'efficacité des vaccins antiaphteux.

L'équipe de l'IFFA a été en mesure de confirmer l'existence d'une corrélation directe entre la réponse des bovins et celle des cobayes à la vaccination avec le vacoin antiaphteux et d'établir le nombre des doses de vaccin (DP 50) susceptibles de protéger 50 pour cent des cobayes, contenues dans une dose bovine de vaccin inactivé. A partir de cette valeur, exprimant l'efficacité moyenne du vaccin pour le cobaye, il est possible de déduire l'efficacité moyenne pour les bovins et, par conséquence, le pourcentage moyen de protection pour ces derniers. La relation entre la dose de protection 50 pour cent pour le cobaye et la dose de protection 50 pour cent pour les bovins varie selon les souches et doit, par conséquent, être établie pour chacune des

souches utilisées dans la composition du vaccin. En tenant compte de ces conditions et en utilisant des cobayes appropriés (race de Pirbright), il est possible de réduire dans une large mesure le nombre de bovins nécessaires pour effectuer le contrôle des vaccins dans le cas des vaccins trivalents.

Au cours de la discussion, il a été admis que la corrélation cobaye-bovin implique une stabilité parfaite des souches de virus et par conséquent exige un contrôle scrupuleux et périodique des souches utilisées dans la production du vaccin.

Le Dr Lucam (Lyon) et le Dr Gayot (Alfort) ont illustré les résultats des épreuves officielles des vaccins antiaphteux, effectués aux laboratoires de Lyon et d'Alfort. Les deux chercheurs ont déclaré que l'extension des épreuves d'innocuité et d'efficacité à la grande majorité des vaccins produits en France a contribué à l'amélioration de la qualité moyenne des vaccins français. Exprimée en valeurs, conformément à l'indice d'évaluation K (épreuve de Lucam), la qualité s'est progressivement améliorée à partir de 1960, atteignant la valeur de 2,3 en 1961, 2,35 en 1962, 2,55 en 1963 et 3 en 1964. En 1965 on a enregistré une amélioration ultérieure, correspondant à une protection des bovins de 98 pour cent. D'après le Dr Lucam, grâce à l'emploi de cobayes pour les épreuves de contrôle effectuées conformément aux dispositions en vigueur en France on peut éviter de se servir de bovins dans 70 à 80 pour cent des cas. Aucun lot de vaccin n'a été refusé au cours des épreuves de contrôle effectuées sur les 150 lots produits par l'Institut de Lyon en 1965.

Le Dr Gayot, rendant compte des résultats des contrôles effectués à Alfort sur 87 lots (campagne 1965/66) a confirmé les déclarations du Dr Lucam en ajoutant quelques observations sur l'interprétation statistique des résultats obtenus. Il a confirmé l'innocuité totale de tous les vaccins présentés au contrôle. D'une étude comparée des valeurs de l'indice K effectuée en 1965 pour les valences O (K = 2,97), A (K = 2,81) et C (K = 2,94) on a tiré la conclusion que la variance de la valence A est nettement plus grande que celle des valences C et O, d'où il apparaît que les valeurs de l'indice K pour la valence A sont plus largement variables que pour les valences O et C.

Cette conclusion semble être confirmée par les expériences effectuées par l'IFFA, à savoir que la variabilité de la réponse immunitaire est plus grande pour le vaccin du type A que pour les vaccins des types O et C.

Le Dr Fagg (Pirbright) a présenté un rapport préliminaire sur l'emploi de lapins pour essayer les vaccins antiaphteux inactivés. Il a été démontré que la réponse du lapin aux antigènes aphteux inactivités est proportionnelle à la quantité inoculée. Pour que les expériences futures puissent être comparées, il est essentiel d'avoir recours à des lapins d'une race unique; cependant pour les lapins d'une même race, le sexe et l'âge ne semblent pas devoir influencer la réponse. La quantité d'anticorps formés par le lapin en réponse à l'antigène inactivé est proportionnelle à celle qui est formée par les bovins en réponse au même antigène. Etant donné que le taux d'anticorps correspondant à la protection des bovins est connu (color test), on peut conclure qu'un vaccin donnant lieu à une réponse en anticorps supérieure à un minimum est capable de protéger des bovins contre un virus virulent. Les résultants communiqués jusqu'à présent ne s'appliquent qu'à une seule souche de virus. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour déterminer s'il existe une corrélation similaire avec d'autres types de virus entre lapins et bovins.

2. Production de vaccin antiaphteux sur cultures cellulaires

Les progrès réalisés au cours des années récentes par les Instituts de Pirbright et de Brescia dans la production de vaccin antiaphteux sur les cultures de cellules BHK 21 en suspension profonde, ont été illustrés respectivement par le Dr Capstick (Pirbright) et le Dr Nardelli (Brescia). A l'exception de quelques détails secondaires, par exemple l'emploi de méthodes d'agitation différentes, la culture de cellules BHK 21 en suspension profonde dans les deux Instituts est basée sur les mêmes principes, notamment en ce qui concerne la lignée des cellules, les milieux de cultures et le

contrôle automatique de la température et du pH. La préparation du vaccin présente aussi une certaine différence, Pirbright utilisant l'acéthyléthylèneimine (ABI) comme inactivant, tandis que Brescia utilise la formaline. Les deux Instituts ont trouvé que la culture de cellules BHK 21 en suspension profonde permet d'obtenir rapidement un substratum cellulaire qui peut être stocké pendant longtemps sous forme de banque de cellules. Les cellules peuvent, à partir de cette banque, être facilement multipliées à une échelle industrielle dans un dispositif stérile nécessitant relativement peu de main-d'oeuvre. Les antigènes produits par cette méthode sont des agents immunisants efficaces, comme le prouvent les résultats des épreuves d'efficacité effectuées à Pirbright sur les bovins et à Brescia sur les cobayes.

Le Dr Nardelli a lui aussi rendu compte des récentes expériences effectuées à Brescia sur la possibilité d'effets cancérogènes sur le hamster syrien de l'inoculation de cellules viables BHK, d'extraits exempts de cellules, de cellules traitées au formol, de cellules traitées par le chloroforme, de virus inactivés cultivés sur ces cellules et de vaccins inactivés préparés à partir des mêmes cellules. Les résultats ont démontré que seules les cellules BHK intactes et viables étaient susceptibles de produire des tumeurs chez le hamster; aucune réaction cancéreuse n'a été observée après l'injection de n'importe laquelle des préparations mentionnées.

Au cours de la discussion sur ces deux documents, le Dr Capstick a déclaré que bien qu'on ait utilisé du sérum de cheval pour la culture de virus, aucun symptôme d'anaphylaxie n'a été observé jusqu'à présent (150 000 doses appliquées), et que le prélèvement de virus pour la production de vaccin est effectué au moment où la courbe ascendante du pouvoir de fixation du complément croise la courbe descendante du titre du virus (c'est-à-dire peu de temps après que l'infectivité maximale a été atteinte).

Après une discussion sur les problèmes posés par l'emploi des cellules BHK en médecine vétérinaire, illustrée par des références bibliographiques et des informations sur les recherches récemment effectuées sur ce sujet, le Groupe de recherche est parvenu aux conclusions suivantes :

Considérant :

(a) La facilité avec laquelle on parvient désormais à obtenir une intense multiplication des lignées de cellules BHK 21 en suspension;

(b) La sensibilité de ces cellules au virus aphteux, ce qui permet de préparer des suspensions virales ayant un titre d'infectivité et un pouvoir de fixation du complément plus élevés;

(c) La valeur immunogène des antigènes obtenus;

(d) La simplicité de l'appareillage et de sa manipulation;

(e) Le fait que l'emploi de vaccins dérivés des cellules BHK est dépourvu de tout danger pour les animaux, comme le prouvent les résultats expérimentaux suivants :

1. Le fait que l'activité cancérogène des cellules ne se manifeste que chez les hamsters et l'absence de toute activité cancérogène lorsque les cellules sont inoculées aux bovins, aux moutons, aux porcs, aux rats, aux lapins, aux cobayes et aux souris;

2. L'absence d'activité cancérogène chez le hamster lorsque les cellules sont tuées, ou lorsque les extraits cellulaires sont débarrassés des cellules viables;

3. L'innocuité pour les hamsters et pour les bovins de vaccins antiaphteux traités par le bétapropiolactone ou par le formol;

le Groupe estime que l'emploi des cellules BHK 21 est valable et important pour la préparation des vaccins antiaphteux et estime que cette nouvelle technique pourra compléter les méthodes actuellement employées dans les laboratoires pour produire des vaccins.

Le Dr Lucam a rendu compte des résultats obtenus par lui-même et par son équipe dans la culture de virus aphteux dans un milieu stationnaire de cellules rénales de veau. Confirmant les résultats positifs qui avaient déjà été obtenus par d'autres chercheurs, le Dr Lucam estime qu'un supplément d'information est nécessaire sur certains facteurs qui affectent d'une manière ou d'une autre la production du virus par cette méthode. Cependant son équipe n'a rencontré aucune difficulté dans la culture du virus aphteux avec la méthode en question. Le titre du virus, après une croissance de 18 à 28 heures dans la culture de tissus, avait atteint la valeur de $10^{7,5}$ DI 50/ml.

Pour obtenir du vaccin ayant une activité correspondant au minimum requis en France pour le vaccin de la classe I (indice K d'au moins 1,2), il est nécessaire que le virus ait $10^{7,5}$ DI 50 par dose vaccinale.

Commentant ces résultats, le Dr Willems a déclaré qu'il a dû soumettre les cultures à une agitation suffisante pour obtenir des virus ayant un pouvoir antigénique considéré comme satisfaisant d'après la mesure du coefficient de fixation du complément. Avec la technique des suspensions cellulaires stationnaires, il a obtenu des résultats moins prometteurs.

Répondant au Dr Brooksby, le Dr Lucam a rappelé qu'il serait prématuré de recommander un emploi généralisé de la technique des suspensions cellulaires stationnaires pour la culture du virus destiné à la production des vaccins.

Le Dr Girard a fait un rapport sur le travail de recherche qu'il a effectué à Ankara avec ses collègues turcs sur les épreuves de fixation du complément appliquées aux antigènes traités par l'Arcton. Cette recherche avait pour objet de mettre au point une méthode permettant de déterminer le titre antigénique d'une culture virale, cette détermination étant plus sûre que la mesure du titre d'infectivité et des données fournies par l'application de la fixation du complément au virus non traité par l'Arcton. Un résultat positif a été obtenu et les vaccins expérimentaux préparés avec des virus cultivés sur tissus ne contenant que de la saponine comme adjuvant, ont révélé une activité antigénique considérable, qu'il faut mettre en corrélation avec le coefficient de fixation du complément appliqué au virus traité par l'Arcton.

3. Epizootologie

Le Dr Moosbrugger a présenté quelques cas singuliers observés au cours de la dernière épizootie en Suisse (octobre 1965 à avril 1966) concernant l'apparition de types de virus autres que ceux de l'épizootie en cours (type O); ces cas semblent corroborer l'hypothèse formulée au cours d'observations précédentes, à savoir la possibilité que le virus aphteux ait subi une mutation en cours d'épizootie. Pour éviter toute équivoque dans la classification des sous-types, le Dr Moosbrugger a rappelé que O Lausanne, O Brent (Bâle) et O Suisse (Pirbright) sont le même sous-type.

Le Dr Davie (Pirbright) a présenté un document sur la situation actuelle des sous-types de virus aphteux. Il a notamment porté son attention sur la souche A_{22} et sur les techniques appliquées actuellement à Pirbright pour différencier les souches. Le Laboratoire de référence mondial a démontré l'affinité, malgré les différences secondaires, entre les sous-types du virus O observés depuis 1962 en Europe occidentale, en Syrie, en Israël, en Turquie et en U.R.S.S.

Les mêmes affinités ont été mises en lumière également pour les sous-types du virus A et plus récemment pour ceux du virus SAT_3. La recherche sur les sérums prélevés sur le terrain en différentes régions du monde a complété l'étude épizootologique de la maladie et tend de plus en plus à orienter la prophylaxie spécifique vers l'emploi

de vaccins homogogues. En comparant les souches de virus du terrain, les épreuves de séro-neutralisation croisée, effectuées avec les sérums spécifiques de la souche produits sur les cobayes ou les bovins convalescents, présentent un grand intérêt pour le choix des souches de virus destinées à la production de vaccin.

Le Dr Hedger (Pirbright) a illustré les résultats d'études sur le terrain effectuées au Bétchouanaland en vue de déterminer l'état d'immunité du cheptel dans trois zones différentes. En particulier, le degré de réponse hétérotypique à la vaccination a été évalué dans des zones où existait une sensibilisation des bovins aux virus SAT_1 et SAT_3 du fait de l'infection ou de la vaccination. Les résultats obtenus suggèrent que la formation d'anticorps hétérotypiques peut avoir lieu avec les deux souches de virus. La méthode consistant à employer du vaccin sur des groupes d'essai d'une population animale apparaît d'une valeur particulière pour l'évaluation des résultats probables de la vaccination préventive de populations entières dans différentes régions écologiques.

Au cours de la discussion, on a demandé au Dr Hedger s'il avait remarqué des différences selon les groupes d'âge. Il a répondu que le système d'élevage tel qu'il est pratiqué au Bétchouanaland, de même que la maturité sexuelle retardée de Bos indicus, ne permettent pas d'établir une corrélation avec les bovins européens pour les groupes d'âge de moins de trois ans.

Le Dr Burrows (Pirbright) a rendu compte d'une série d'observations fort intéressantes effectuées sur l'état de porteur de virus suivant le contact avec le virus aphteux.

Utilisant l'appareillage mis au point par le Dr van Bekkum pour le prélèvement d'échantillons à partir de la région rétropharyngée de bovins infectés par inoculation intradermolinguale et chez lesquels s'était développée une forme grave et généralisée de la maladie, le Dr Burrows a pu isoler le virus du type A 119 sur un des dix bovins examinés au bout de quinze mois après l'infection et sur deux des quatre autres animaux examinés, quatorze mois après l'infection (A Turquie). D'autres types de virus n'ont pas montré une persistance aussi longue. La virulence et les caractéristiques antigéniques des virus isolés chez ces animaux porteurs ont été également étudiées. Le virus isolé chez des porteurs de souches A a montré un pouvoir infectieux réduit pour la langue de bovin, mais n'a révélé aucune diminution de la gravité des lésions secondaires : d'autres types sont apparus en pleine virulence. On a noté l'apparition d'une variation antigénique de la souche A_{119} chez un animal, entre la 14e et la 19e semaine suivant l'infection. Au cours d'une étude préliminaire on a étudié la persistance des virus modifiés sur des animaux utilisés pour des tests d'innocuité et d'efficacité pour essayer des vaccins à virus vivant modifié. Les résultats de ces travaux font apparaître qu'un petit pourcentage seulement de bovins sont restés porteurs de virus après inoculation intramusculaire de virus modifié. Après inoculation de la langue ou pulvérisation au niveau du rétropharynx, il est apparu jusqu'à 50 pour cent de porteurs avec certaines souches modifiées. Des moutons ont été également infectés avec des souches de virus virulents et les résultats ont fait apparaître que la majorité de ces animaux n'étaient plus porteurs de virus quatre mois après l'infection. La persistance du virus virulent chez 56 porcs n'a pu être mise en évidence au bout d'un délai de dix jours après infection (on avait utilisé quatre souches de virus).

Au cours de la discussion qui a suivi son rapport, le Dr Burrows a ajouté que le premier prélèvement du virus s'est effectué sur une culture de tissus (cellules BHK), que les porcs avaient été infectés par contact, que des souris avaient été utilisées pour le prélèvement du virus modifié et que tous les porteurs présentaient des anticorps sériques. A ce propos, le Dr Brooksby a rappelé les résultats du travail de recherche effectué par le Dr Henderson, qui a constaté que des veaux nés de mère vaccinée avec du vaccin vivant modifié présentaient une persistance du virus, bien qu'on n'ait pu démontrer la présence d'anticorps.

Le Dr Lucam a décrit les résultats d'une étude comparée des variantes O Flandres (1947) et O Lausanne (1965), avec une interprétation statistique des valeurs obtenues au cours d'expériences de protection croisée. La conséquence pratique de ces constatations est qu'un certain nombre de vaccins préparés avec la seule souche O Flandres est dont l'activité contre cette souche est égale ou peu supérieure à l'activité minimale requise, (K = 1,2) pour les vaccins antiaphteux en France, ne donneront qu'une protection nettement insuffisante contre la souche O Lausanne. Au cours de la discussion sur ce point, on a fait remarquer que l'interprétation de l'indice K pourrait ne pas s'appliquer à toutes les variantes d'un type de virus donné.

4. Structure du virus aphteux

Le rapport du Dr Brown (Pirbright) est une revue de l'état actuel des connaissances sur la structure du virus aphteux.

Un rapport a été présenté par le Dr Cowan (Plum Island) qui, avec le Dr Graves, a démontré l'existence d'un nouveau composant antigénique (dénommé VIA ou "virus infection-associated antigen" - antigène du virus associé à l'infection) dans des liquides provenant de tissus infectés avec du virus aphteux, ce composant n'apparaissant pas faire partie intégrante du virus. On a formulé l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'un élément entrant dans la synthèse du virus.

Une discussion et des démonstrations sur la structure du virus ont eu lieu dans le laboratoire du Dr Brown.

5. Immunisation du porc

La relation du Dr van Bekkum (Pays-Bas) portait notamment sur les résultats des campagnes de vaccination de porcs effectuées à l'occasion de la récente et grave épizootie porcine aux Pays-Bas (octobre 1965 - printemps 1966) et dont l'agent causal était le virus du type C. Au cours de la première campagne (municipalité de Deurne), 56 000 porcs ont été vaccinés en une semaine (9 - 17 novembre), le dernier cas d'infection ayant été signalé le 24 novembre (entre-temps, 26 exploitations agricoles avaient été infectées). Au cours de la deuxième campagne, 14 300 porcs ont été vaccinés en un seul jour (village de Schayk) et onze jours après un autre foyer avait été décelé. Dans les autres zones atteintes par la maladie, la vaccination unique ou de rappel (intervalle de quinze jours) a donné des résultats qui, tout en étant d'une interprétation difficile, étaient en général nettement favorables. Des vaccins concentrés ou normaux (dose bovine) ont été utilisés; aux essais de laboratoire, le vaccin concentré s'est montré nettement plus efficace. En général des cas de maladie ont continué de se manifester jusqu'à 10 jours après l'application sur le terrain de chacun des types de vaccin. La rapidité avec laquelle ces vaccinations ont été effectuées sur le terrain et le pourcentage de porcs susceptibles d'infection ayant subi la vaccination ont contribué d'une manière déterminante au succès des campagnes, succès qui aurait été aléatoire sans une action adéquate, rapide et coordonnée.

Le deuxième rapport sur l'immunisation des porcs a été présenté par le Dr McKercher et a été le résultat d'expériences effectuées avec le Dr Giordano à Plum Island en vue d'obtenir un supplément d'information sur la réponse immunitaire du porc inoculé avec du virus aphteux virulent, avec du virus aphteux traité par des produits chimiques combinés avec un adjuvant huileux et avec des virus aphteux traités chimiquement avec un adjuvant au gel d'hydroxyde d'aluminium. Au cours des expériences, on a notamment observé les faits suivants : 1. Les porcs guéris à la suite de l'infection expérimentale par la fièvre aphteuse peuvent être réinfectés par le virus homologue. 2. Les sérums de porcs inoculés avec le virus aphteux traité par un produit chimique (glycidaldéhyde - GDA, ou acétyléthylèneimine - AEI) et associé avec un adjuvant huileux ont présenté un taux d'anticorps persistant et les porcs ont résisté à l'épreuve de mise au contact avec des porcs infectés pendant au moins 90 jours. 3. Le taux d'anticorps a été notablement plus élevé chez les animaux inoculés avec le virus traité et associé avec l'adjuvant huileux que chez ceux inoculés avec le virus traité et associé avec l'hydroxyde d'aluminium.

Le troisième rapport sur cette question a été présenté par le Dr Burrows (Pirbright) qui a traité des résultats d'expériences effectuées à Pirbright en utilisant des vaccins à base de virus aphteux inactivés par traitement à l'acétyléthylèneimine (AEI). Ce rapport confirme la difficulté d'obtenir une réponse immunitaire chez le porc, susceptible de lui permettre de résister à l'inoculation expérimentale de virus. Cependant les résultats font apparaître une corrélation certaine entre le titre d'anticorps et la réaction consécutive à la dose d'épreuve (inoculation podale). Le taux d'immunité 50 pour cent est approximativement de 1,5, valeur semblable à celle trouvée pour les bovins éprouvés par inoculation linguale.

Le rapport du Dr Lucam, le quatrième de la série, consiste en deux parties. La première est une revue bibliographique des matériels et méthodes utilisés dans la vaccination du porc. La conclusion est qu'il est impossible de préconiser la vaccination sur la base des données et des opinions trouvées dans les références bibliographiques consultées. La deuxième partie traite d'une expérience effectuée à Lyon en vue de déterminer la dose protectrice 50 pour cent (DP 50) susceptible d'empêcher chez le porc l'apparition de lésions secondaires par suite de l'inoculation de virus d'épreuve virulents. Interprétant les résultats obtenus, le Dr Lucam estime qu'il serait illusoire d'espérer obtenir une immunisation correcte du porc avec les vaccins dont on dispose actuellement.

Au cours de la discussion qui a suivi sur la vaccination du porc, de nombreuses remarques ont été exprimées contre les conclusions assez pessimistes que le Dr Lucam a tirées de ses recherches bibliographiques et de laboratoire. Le Dr Ubertini (Brescia) a estimé que :

1. Le fait que la vaccination des porcs ait donné de meilleurs résultats sur le terrain qu'au laboratoire n'est nullement paradoxal, si l'on tient compte de la moindre gravité des risques d'infection sur le terrain. 2. En Italie, la vaccination de grandes porcheries formées d'unités séparées a réussi à enrayer la maladie à l'intérieur même de la porcherie, toutes les fois qu'elle a été pratiquée à temps. 3. La double vaccination (à un mois d'intervalle) donne une excellente protection même contre des risques graves d'infection. 4. Lorsqu'on infecte les animaux dans des conditions expérimentales, l'infection devrait être transmise par contact, en utilisant la même souche de virus que celle ayant servi à la préparation du vaccin.

Le Dr Leunen (Bruxelles) a participé à la discussion en présentant une analyse des résultats obtenus en Belgique au laboratoire et sur le terrain notamment à l'occasion de la dernière épizootie (virus C). Il a été en mesure d'obtenir au laboratoire une résistance de 90 à 100 pour cent et de presque 100 pour cent sur le terrain sur des porcs en utilisant une dose bovine de vaccin belge (produit à cette occasion à partir d'un virus d'origine porcine). L'efficacité du vaccin a été essayée sur les porcs par injection de 1 000 DI 50 dans le sillon coronaire et la protection est restée très satisfaisante au bout de douze semaines. De vastes campagnes sur le terrain effectuées pendant l'hiver 1965-66 dans deux différentes régions du pays en appliquant deux différentes méthodes ont démontré clairement que l'on peut attendre d'excellents résultats d'une vaccination obligatoire rapide de tous les porcs exposés à des risques d'infection. Le vaccin doit être injecté par voie sous-cutanée, l'injection pratiquée dans la cuisse donnant les meilleurs résultats.

Le Dr van Bekkum a déclaré qu'il partageait cette opinion et a expliqué pourquoi les résultats de la vaccination sur le terrain sont meilleurs que ceux de la vaccination effectuée au laboratoire. Il a mentionné l'expérience très utile acquise au cours de ces dernières années dans les Laboratoires d'Etat à la suite de l'emploi généralisé de la vaccination des porcs.

Le Dr Moosbrugger a conclu en affirmant que le danger de contamination, facilité par l'intensité croissante du trafic des animaux, de même que les résultats obtenus jusqu'à présent sur le terrain, font de la vaccination des porcs une mesure indispensable toutes les fois qu'une épizootie porcine se manifeste. Il a donné quelques exemples de l'élimination de foyers infectieux grâce à la vaccination des porcs dans une zone infectée.

6. Immunisation du mouton

Le rapport du Dr Fontaine (IFFA) sur la vaccination antiaphteuse du mouton résume une série d'expériences dont l'exécution avait été recommandée par la Commission européenne au Groupe de recherche en vue d'établir le dosage du vaccin pour les ovins.

Se basant sur le contrôle de la virémie, il a été possible d'établir la DP 50 du vaccin à différents intervalles après la vaccination. La conclusion a été que 1/3 ou 1/4 de la dose utilisée couramment chez le boeuf devrait conférer une solide immunité au mouton pendant au moins cinq ou six mois après la première vaccination. Il est important de noter que le degré de réponse immunitaire du mouton à la vaccination, mesuré à différents intervalles après la vaccination, ne correspond pas aux données relevées chez les bovins (la dose protectrice 50 est 1/27e de la dose bovine 20 jours après la vaccination et 1/13e 25 jours après la vaccination).

Au cours de la discussion, le Dr Fontaine a déclaré qu'il n'a jamais observé d'infection généralisée sans virémie, mais que la virémie peut être transitoire chez le mouton, qui est une modification de la technique de Henderson appliquée à la langue du mouton (4 points d'inoculation par dilution). Cette méthode permettrait de calculer facilement la DP 50 par observation directe de la langue.

VISITE DES PARTICIPANTS AU LABORATOIRE

Cultures de tissus

Une démonstration a été effectuée sur la construction des cuves en acier inoxydable pour les cultures des cellules en suspension. La production des cellules comporte un système de cultures qui commence par 1 litre et arrive progressivement à 5, 30 et 100 litres. On fait passer les cellules de l'une à l'autre de ces cuves au moyen de tubes en acier inoxydable, de manière à maintenir un circuit fermé en agitation. La technique de l'infection des cellules a été décrite. On a estimé utile de faire une sédimentation de cellules et de changer le milieu de culture pendant la nuit précédant l'infection.

Le problème de la stérilisation de l'air évacué a été résolu grâce à l'emploi de fours à moufle maintenus à 350°C.

Les vaccins produits à partir de virus préparés suivant cette méthode ont donné des résultats aussi bons, voire meilleurs, que les vaccins similaires Frenkel provenant des mêmes souches virales.

Visite à la Section des vaccins

L'appareil de Silverson pour la préparation des suspensions de tissus a fait l'objet d'une démonstration. Cet appareil permet d'émulsionner les tissus dans une cuve hermétiquement fermée, de manière à empêcher toute fuite d'aérosols infectieux. On a également effectué des démonstrations sur la technique de traitement des souris sous des hottes hermétiquement fermées, de manière à empêcher toute fuite d'aérosols infectieux. On a également effectué des démonstrations sur la technique de traitement des souris sous des hottes hermétiques, qui permettent d'opérer avec différentes souches virales dans le même laboratoire en réduisant au minimum les infections croisées; dans une pièce d'environ 10 m x 3 m, on peut manipuler 18 différentes souches. L'appareil décrit par Fagg en 1965 et servant à étudier l'inactivation des virus a également fait l'objet d'une démonstration.

Virus transmis par les arthropodes

La croissance du virus de la Forêt de Senliki sur les cellules BHK varie suivant le clone du virus utilisé. Le virus naturel original produit un composant interférant qui empêche d'obtenir des titres élevés. En sélectionnant les clones, on peut préparer normalement des suspensions ayant un titre élevé et exemptes de composant interférant.

Epizootologie

Des démonstrations ont été faites sur les procédures actuelles de typage et de sous-typage des virus. On a mis au point un micro-test qui a donné des résultats satisfaisants. Des cultures de cellules de thyroïde bovine semblables à celles décrites par Snowden, sont actuellement utilisées pour isoler le virus à partir d'échantillons prélevés sur le terrain. Cette méthode permet de mieux sélectionner par région les échantillons provenant d'outre-mer. Pour ce qui est des titrages comparés, ces cultures sont de quatre à plusieurs centaines de fois plus sensibles que les autres cultures de cellules BHK utilisées pour l'inoculation des souris ou de la langue des bovins.

On a donné quelques détails sur le cas d'un ouvrier agricole infecté par la fièvre aphteuse dans le Northumberland.

Peste porcine africaine

L'épreuve de fixation du complément a été appliquée à la détection de l'antigène viral dans les nodules lymphatiques de la rate des porcs infectés de peste porcine africaine. On a obtenu une bonne fixation et, une fois qu'on aura amélioré les techniques permettant de supprimer les effets non spécifiques, cette méthode pourra être appliquée au diagnostic de la maladie.

Biochimie

Les méthodes actuellement utilisées dans l'étude biochimique des virus ont fait l'objet d'une démonstration. Elles comprennent notamment la centrifugation fractionnée dans une solution de saccharose ainsi que des études sur la synthèse de l'ARN au moyen de traceurs radioactifs.

Pathologie

Quelques-uns parmi les facteurs influençant l'infection généralisée de la maladie ont été discutés.

REUNION DU GROUPE DE RECHERCHE

Les Membres du Groupe de recherche (les Dr J.B. Brooksby, R. Willems, B. Ubertini, J.G. van Bekkum et E. Michelsen) ont participé à la Réunion.

Les activités du Groupe de recherche ont été passés en revue et les Membres du Groupe ont exprimé leur satisfaction quant au travail entrepris et mené à bonne fin au cours de ces dernières années en collaboration avec les chercheurs provenant d'autres laboratoires.

On est généralement convenu que l'activité future du Groupe devrait se concentrer surtout sur les visites aux laboratoires et sur les discussions avec les chercheurs, conformément aux activités entreprises par le Groupe aussitôt après son institution.

La requête présentée par la Délégation danoise au cours de la treizième session de la Commission, visant à l'amélioration de l'échange international d'informations sur la fréquence de la maladie et les résultats du typage, a été examinée et discutée. Le Dr Brooksby a rappelé que le Laboratoire de référence mondial faisait de son mieux quant à la distribution des informations sur les types et les sous-types identifiés à partir des échantillons provenant des pays en voie de développement ou des laboratoires. Les laboratoires européens ont été en mesure d'effectuer le typage normal d'une manière très satisfaisante et le Laboratoire de référence mondial est prêt à donner son assistance toutes les fois qu'un problème particulier se présentera. Ce qui importe surtout, c'est d'améliorer le rassemblement et l'échange des informations entre les laboratoires et les services vétérinaires; le Groupe continuera de travailler en vue de résoudre ce problème.

Ayant accepté l'invitation officielle qui lui avait été communiquée par le Directeur de l'Institut de Plum Island, le Groupe de recherche a décidé de tenir sa prochaine réunion à Plum Island en septembre 1967. L'ordre du jour définitif de cette réunion sera établi après consultation avec le Dr Callis.

Les travaux effectués par les différentes sections de l'Institut de Plum Island dans le domaine de la fièvre aphteuse devraient servir de sujets de discussions et d'échanges de vues entre les chercheurs américains et européens.

ANNEXE 1

CONTROLE QUANTITATIF DU VACCIN ANTIAPHTEUX INACTIVE MONOVALENT ET TRIVALENT SUR COBAYES

ETUDE DE LA LOI DOSE-EFFET ET EQUIVALENCE ENTRE LES DOSES VACCINANTES 50 % CHEZ LES COBAYES ET LE POURCENTAGE DE PROTECTION CHEZ LES BOVINS

par

J. Terre, C. Stellmann, P. Bornarel, M. Roumiantzeff,
H. Favre, J. Fontaine et C. Mackowiak *

Depuis 1960, nous nous sommes attachés à mettre au point une technique de contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux sur cobayes dont les différentes étapes ont été relatées dans plusieurs notes (2, 3, 5, 7).

Au Comité technique permanent de lutte contre la fièvre aphteuse en 1965, nous avons présenté un rapport faisant le point des résultats alors obtenus pour le contrôle des vaccins antiaphteux inactivés, monovalents, sur cobayes et la corrélation existant entre les Doses Vaccinantes 50% établies sur cobayes et sur bovins. L'établissement des normes de contrôle exposées à cette réunion avait nécessité l'emploi de 15 000 cobayes et 1 000 bovins.

Ces normes ont été appliquées depuis une année au contrôle de routine de tous nos vaccins monovalents, nous avons ainsi utilisé environ 4 500 cobayes et 400 bovins à titre de vérification du système au lieu des 1 000 qu'auraient exigés les contrôles de notre production.

Le but du travail présenté ici était double :

- compléter et confirmer nos précédentes conclusions concernant le contrôle d'activité du vaccin monovalent sur cobayes.

- étudier la possibilité du contrôle d'activité du vaccin trivalent et, le cas échéant, en préciser les normes.

Au cours de ces expériences, nous avons été amenés à comparer l'activité du vaccin monovalent à celle de la valence correspondante dans le mélange trivalent.

Nos conclusions seront tirées de l'analyse des résultats correspondant à l'utilisation d'environ 20 000 cobayes et de plus de 1 600 bovins.

---

* Institut Français de la Fièvre Aphteuse, Lyon.

A - MATERIEL

1. Vaccins

- Les vaccins monovalents de production industrielle sont fabriqués suivant la technique déjà exposée (1). La dose bovine est de 1,66 ml. En pratique nous utilisons 1,6 ml.

- Les vaccins trivalents sont obtenus en mélangeant à parties égales des vaccins monovalents des trois types O, A et C. La dose bovine est 5 ml, soit trois doses monovalentes.

Afin d'étalonner la technique, nous n'avons étudié que des vaccins trivalents composés de monovalents complètement titrés sur bovins et sur cobayes par la technique de la DVB_{50} et de la DVC_{50}.

(DVC_{50} : Dose vaccinante cobayes protégeant 50 pour cent des cobayes lors de l'épreuve virulente avec 10 000 doses infectieuses 50% pour le cobaye, 10 jours après la vaccination.

DVB_{50} : Dose vaccinante bovine protégeant 50 pour cent des bovins lors de l'épreuve virulente avec 10 000 doses infectieuses 50% pour le bovin, 22 jours après la vaccination).

Composition des vaccins trivalents utilisés :

- No 2 067 : vaccin monovalent O No 1 119
  " " A No 5 220
  " " C No 5 319
- No 2 102 : vaccin monovalent O No 5 140
  " " A No 5 233
  " " C No 5 324
- No 2 123 : vaccin monovalent O No 5 140
  " " A No 5 240
  " " C No 5 338
- No 2 125 : vaccin monovalent A No 5 245
  " " C No 5 338

La valence O comportant un mélange de deux vaccins monovalents O préparés, l'un avec la souche O Flandres (No 5 140), et l'autre avec la souche O Espagne 64 (No 5 145), les résultats ne seront pas présentés dans le cadre de ce travail.

2. Souches de virus

Les souches de virus utilisées pour la production du vaccin et pour l'épreuve des animaux sont les souches classiques de l'Institut :

O Flandres

A Allier 1960

C Vosges 1960

La technique de préparation du virus d'épreuve reste inchangée.

3. Cobayes

Il s'agit toujours de cobayes Albinos (souche de Pirbright) élevés dans des conditions parfaitement codifiées (1).

4. Bovins

Nous utilisons toujours des bovins provenant du Finistère (7).

B - METHODES

1. Vaccination

a) Vaccins monovalents

Si rien n'a été changé dans le cas des bovins, par contre une modification est intervenue pour la vaccination des cobayes, en effet, à partir de février 1966, on a pris un intervalle plus grand pour la dilution du vaccin : de 3 en 3 au lieu de 2 en 2. De cette façon on n'utilise que 4 groupes de 8 cobayes pour couvrir une zone de dilution finalement plus étendue. Ce point sera repris dans la discussion.

1er groupe : 0,54 ml ($\neq\neq \frac{1,6}{3}$ soit 1/3 dose entière)

2ème groupe : 0,18 ml ($\neq\neq \frac{1,6}{9}$ soit 1/9 dose entière)

3ème groupe : 0,06 ml ($\neq\neq \frac{1,6}{27}$ soit 1/27 dose entière)

4ème groupe : 0,02 ml ($\neq\neq \frac{1,6}{81}$ soit 1/81 dose entière)

b) Vaccins trivalents

Les voies d'inoculation sont les mêmes que pour les vaccins monovalents.

- Bovins : Quatre groupes de 5 bovins reçoivent sous un volume constant de 5 ml :

1er groupe : 5 ml de vaccin pur : 1 dose

2ème groupe : 1,25 ml de vaccin pur : 1/4 dose

3ème groupe : 0,31 ml de vaccin pur : 1/16 dose

4ème groupe : 0,078ml de vaccin pur : 1/64 dose

Ces bovins sont gardés 22 jours en observation dans nos fermes avant de subir l'épreuve virulente.

- Cobayes : Le vaccin No 2 067 n'a pu être titré.

Pour le vaccin No 2 102, l'intervalle de dilution a été de 2 en 2. Cinq groupes de 8 cobayes ont reçu, sous un volume constant de 1,6 ml par la voie intramusculaire, respectivement : 1,6 ml, 0,8 ml, 0,4 ml, 0,2 ml, et 0,1 ml de vaccin pur.

Pour les vaccins No 2 123 et 2 125, l'intervalle de dilution a été de 3 en 3. Quatre groupes de 8 cobayes ont reçu, par la même voie et sous le même volume constant de 1,6 ml, respectivement : 1,6 ml, 0,54 ml, 0,18 ml, et 0,06 ml de vaccin pur.

Tous ces cobayes ont été gardés 10 jours avant l'épreuve virulente.

2. Epreuve - Lecture - Méthode de calcul

Aucune modification de technique n'a eu lieu depuis la précédente publication. Nous conservons la méthode de Litchfield comme méthode de calcul des titres et des paramètres (6).

3. Mode d'expression des résultats

Afin de rendre possibles les comparaisons entre les DV_{50} des vaccins monovalents et celles des valences correspondantes des vaccins trivalents, nous exprimons les DV_{50} de chaque valence des vaccins trivalents en volume de vaccin monovalent et non en volume de vaccin trivalent. (Fig. 11). D'une façon générale, pour éviter les confusions, nous préférons parler de "puissance moyenne" d'un vaccin, c'est-à-dire du nombre moyen de DV_{50} contenues dans une dose bovine entière telle qu'elle est définie par le producteur.

C - RESULTATS

Vaccins monovalents

Tous les lots industriels sont contrôlés sur cobayes.

Sur bovins ont été titrés :

- 9 vaccins monovalents de type O : voir Fig. No 1 et 2
- 8 vaccins monovalents de type A : voir Fig. No 3 et 4
- 6 vaccins monovalents de type C : voir Fig. No 5 et 6

Vaccins trivalents

Les résultats des contrôles sur bovins, valence par valence, des vaccins trivalents No 2 067, 2 102, 2 123 et 2 125 sont présentés respectivement aux Figures No 7, 8, 9 et 10.

La figure No 11 rassemble les valeurs des différents paramètres obtenus sur bovins et cobayes pour chaque vaccin monovalent, et la valence correspondante dans le mélange trivalent.

D - ANALYSE STATISTIQUE

1. Relation dose-effet sur bovins

a) Vaccins monovalents

Les résultats obtenus avec 23 DVB_{50} confirment les conclusions précédentes (1). A savoir, il n'y a pas de différence significative (à p = 0,95):entre les relations dose-effet des différents vaccins d'une même valence, entre les relations dose-effet des différentes valences de vaccins monovalents.

La "fonction de pente", moyenne pondérée S_m' (5) passe de 2,06 à 2,11 et la précision fS_m' sur cette valeur est de 1,09. Cette précision fS_m' correspond à celle d'une moyenne calculée à partir de 23 titrages. La précision fS_i pour un titrage sera de la forme :

$$\log fS_i = \log fS_m' \times \sqrt{23} = (\log 1{,}09) \times \sqrt{23}$$

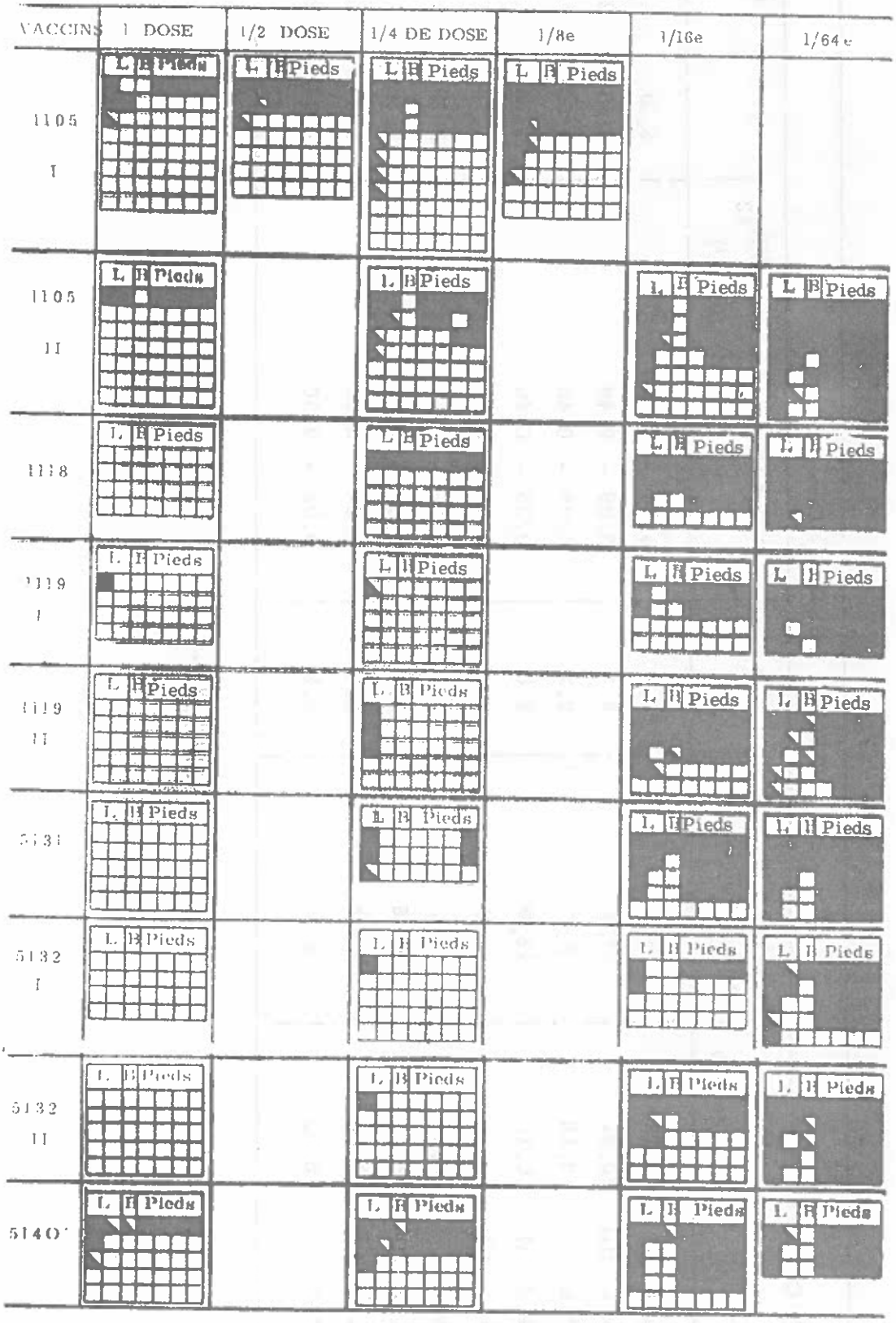
$$fS_i \simeq 1{,}49$$

Les valeurs extrêmes (à p = 0,95) de la pente d'un titrage sont comprises entre $\frac{2{,}11}{1{,}49}$, soit 1,42 et 2,11 x 1,49, soit 3,14.

Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux du rapport précédent où les valeurs extrêmes étaient : 1,52 et 3,14.

FIGURE N° 1

MONOVALENTS O : RESULTATS DES DOSES VACCINANTES 50 % SUR BOVINS



Légende : L = Langue

B = Bouche

VALEURS DES DIFFERENTS PARAMETRES
POUR LES VACCINS MONOVALENTS "O"

VACCINS N°	TITRAGE SUR BOVINS					
	DVB_{50} (en ml)	Puissance Moyenne ($S_m' = 2,15$)	fD	Limites théoriques des DVB_{50} (en ml)	S	fS
1105 (I)	0,27	5,9	1,9	0,14 - 0,51	3,10	2,60
1105 (II)	0,21	7,6	2,3	0,09 - 0,48	3,10	2,00
1118	0,18	8,9	2,2	0,08 - 0,40	2,50	1,70
1119 (I)	0,10	16,0	2,0	0,05 - 0,20	1,70	1,40
1119 (II)	0,10	16,0	1,9	0,05 - 0,19	1,70	1,35
5131	0,35	4,6	2,2	0,16 - 0,77	2,30	1,65
5132 (I)	0,05	32,0	2,2	0,02 - 0,11	2,30	1,50
5132 (II)	0,08	20,0	2,0	0,04 - 0,16	1,80	1,35
5140	0,20	8,0	2,5	0,08 - 0,50	2,90	2,00

Figure N° 2

FIGURE N° 3

MONOVALENTS A : RESULTATS DES DOSES VACCINANTES 50 % SUR BOVINS

VACCINS	1 DOSE	1/4 DE DOSE	1/16e DE DOSE	1/64e DE DOSE
5220	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds
5224	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds
5226	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds
5227	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds
5228	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds
5233	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds
5240	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds
5245	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds

VALEURS DES DIFFERENTS PARAMETRES
POUR LES VACCINS MONOVALENTS "A"

VACCINS N°	TITRAGE sur BOVINS					
	DVB_{50} (en ml)	Puissance moyenne ($S_m' = 2,15$)	fD	Limites théoriques des DVB_{50} (en ml)	S	fS
5220	0,62	2,6	2,0	0,31 - 1,24	2,30	1,50
5224	0,06	26,7	1,7	0,04 - 0,10	1,60	1,90
5226	0,09	17,8	2,0	0,04 - 0,18	2,20	1,50
5227	0,25	6,4	2,0	0,12 - 0,50	2,25	1,50
5228	0,12	13,3	2,2	0,05 - 0,26	1,75	1,40
5233	0,15	10,7	2,6	0,06 - 0,39	2,80	2,00
5240	0,15	10,7	2,3	0,07 - 0,35	2,60	1,75
5245	0,20	8,0	2,0	0,10 - 0,40	2,30	1,50

Figure N° 4

FIGURE N° 5

MONOVALENTS C : RESULTATS DES DOSES VACCINANTES 50 % SUR BOVINS

VACCINS	1 DOSE	1/4 DE DOSE	1/16e DE DOSE	
1317	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds
5319	L B Pieds	L B Pieds	B Pieds	L B Pieds
5320	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B
5322	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	B
5324	L B Pieds	L B Pieds	L B	B
5338	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds	L B Pieds

Légende : L = Langue

B = Bouche

VALEURS DES DIFFERENTS PARAMETRES
POUR LES VACCINS MONOVALENTS "C"

VACCINS N°	TITRAGE sur BOVINS					
	DVB_{50} (en ml)	Puissance Moyenne ($S_{m'}$ = 2,15)	fD	Limites théoriques des DVB_{50} (en ml)	S	fS
1317	0,15	10,7	2,0	0,07 - 0,30	2,30	1,50
5319	0,20	8,0	2,2	0,09 - 0,44	2,30	1,50
5320	0,12	13,3	1,9	0,06 - 0,23	1,80	1,40
5322	0,18	8,9	1,9	0,09 - 0,34	2,50	1,50
5324	0,43	3,7	1,9	0,23 - 0,82	1,70	1,40
5338	0,20	8,0	2,0	0,10 - 0,40	2,30	1,50

Figure N° 6

FIGURE N° 7

RESULTATS DU CONTROLE SUR BOVINS DU VACCIN N° 2067

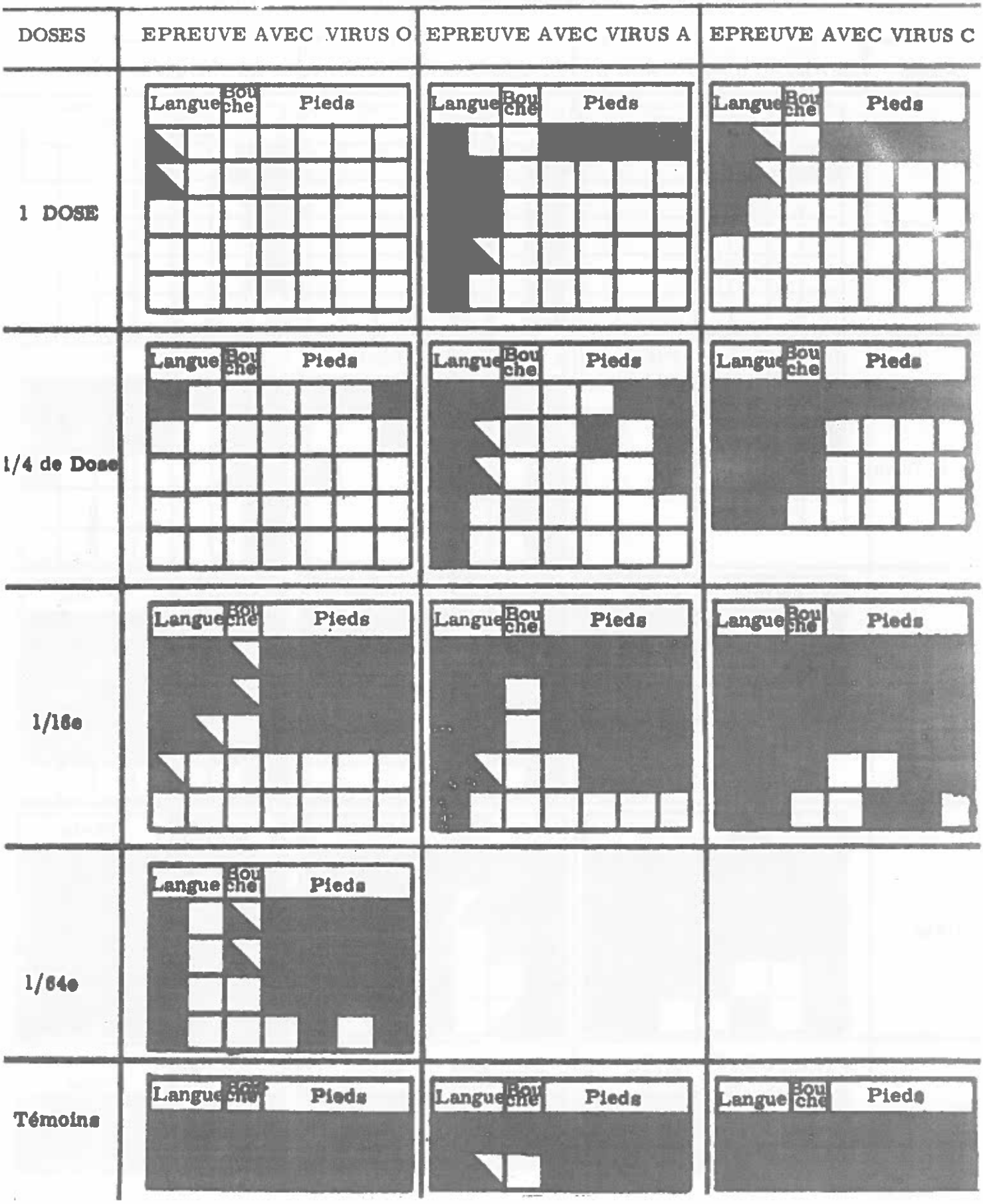


FIGURE N° 8

RESULTATS DU CONTROLE SUR BOVINS DU VACCIN 2102

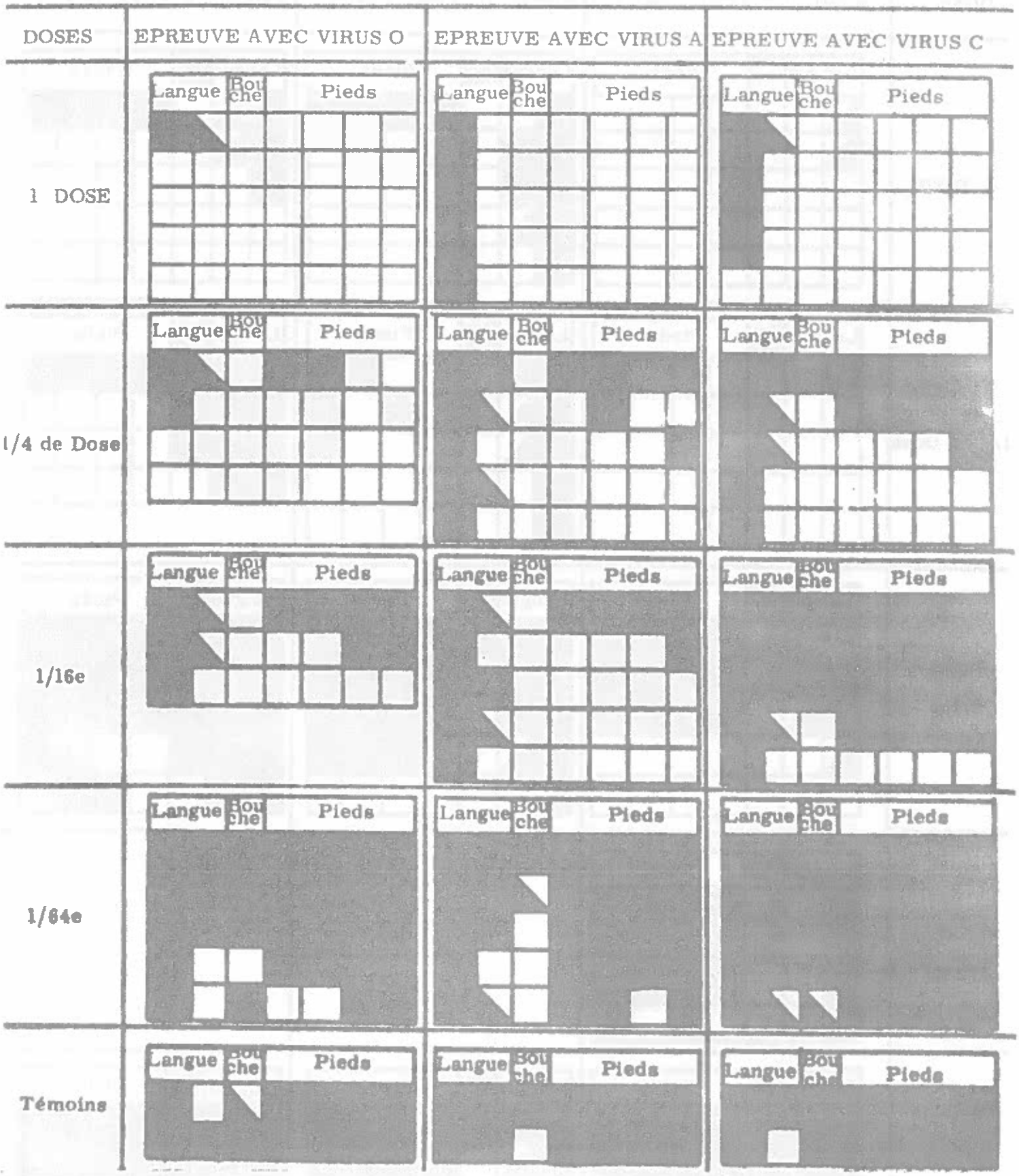


FIGURE N° 9

RESULTATS DU CONTROLE SUR BOVINS DU VACCIN 2123

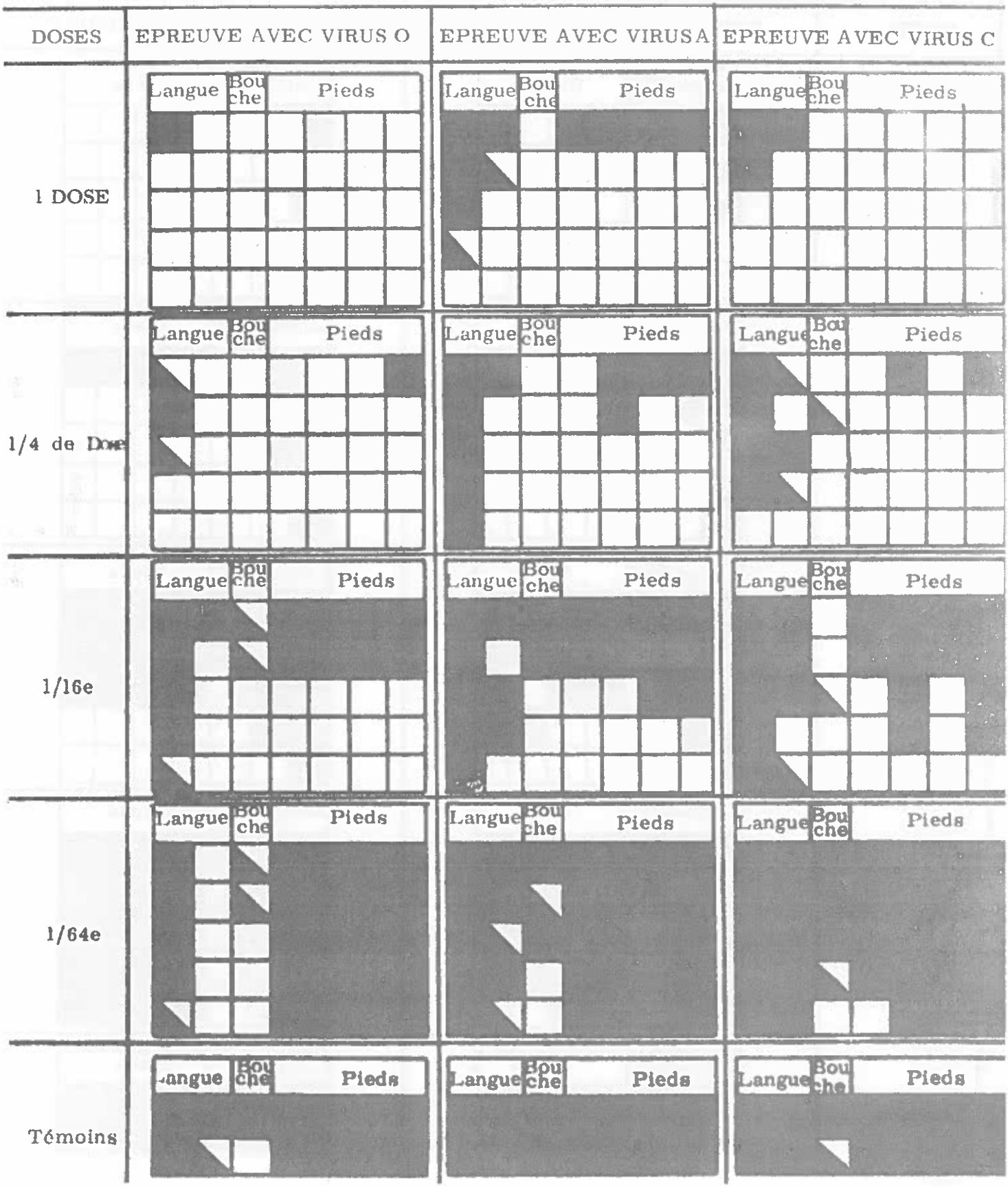


FIGURE N° 10

RESULTATS DU CONTROLE SUR BOVINS DU VACCIN 2125

DOSES	EPREUVE AVEC LE VIRUS A	EPREUVE AVEC LE VIRUS C
1 DOSE	Langue / Bouche / Pieds	Langue / Bouche / Pieds
1/4 DE DOSE	Langue / Bouche / Pieds	Langue / Bouche / Pieds
1/16e	Langue / Bouche / Pieds	Langue / Bouche / Pieds
1/64e	Langue / Bouche / Pieds	Langue / Bouche / Pieds
Témoins	Langue / Bouche / Pieds	Langue / Bouche / Pieds

VALEURS des DIFFERENTS PARAMETRES chez les BOVINS et les COBAYES
Pour les VACCINS TRIVALENTS et les MONOVALENTS CORRESPONDANTS

VACCINS	TITRAGE sur BOVINS						TITRAGE sur COBAYES					
	DVB_{50} (en ml)	Puissance moyenne bovine ($S_m' = 2,15$)	fD	Limites théoriques des DVB_{50} (en ml)	S	fS	DVC_{50} (en ml)	Puissance moyenne cobaye ($S_m' = 2,15$)	fD	Limites théoriques des DVC_{50} (en ml)	S	fS
Mono O N° 1119 (II)	0,10	16,0	1,9	0,05 - 0,19	1,70	1,35	0,10	16,0	1,5	0,07 - 0,15	2,40	1,85
Valence O du 2067	0,15	10,7	2,0	0,07 - 0,30	2,25	1,50	(x)					
Mono A N° 5220	0,62	2,6	2,0	0,31 - 1,24	2,30	1,50	0,20	8,0	1,6	0,12 - 0,32	2,40	1,65
Valence A N° 2067	0,59	2,7	2,0	0,29 - 1,11	2,70	1,60	(x)					
Mono C N° 5319	0,20	8,0	2,2	0,09 - 0,44	2,30	1,50	0,13	12,3	1,6	0,08 - 0,20	2,20	1,50
Valence C N° 2067	0,32	5,0	1,9	0,17 - 0,61	2,10	1,55	(x)					
Mono O N° 5132 (II)	0,08	20,0	2,0	0,04 - 0,16	1,80	1,35	0,24	6,6	1,8	0,13 - 0,43	2,75	1,90
Valence O N° 2102	0,17	9,4	2,6	0,06 - 0,45	2,45	1,75	0,26	6,1	1,4	0,19 - 0,36	1,35	1,20
Mono A N° 5233	0,15	10,7	2,6	0,06 - 0,39	2,80	2,00	0,10	16,0	1,6	0,06 - 0,16	2,30	1,50
Valence A N° 2102	0,20	8,0	2,0	0,10 - 0,40	2,30	1,50	0,10	16,0	1,6	0,06 - 0,16	2,00	1,45
Mono C N° 5324	0,43	3,7	1,9	0,23 - 0,82	1,70	1,40	0,25	6,4	1,6	0,16 - 0,40	2,00	1,80
Valence C N° 2102	0,31	5,1	2,2	0,14 - 0,68	2,5	1,65	0,22	7,3	1,6	0,14 - 0,35	2,10	1,70
Mono O N° 5140	0,20	8,0	2,5	0,08 - 0,50	2,90	2,00	0,28	5,7	1,5	0,19 - 0,40	1,70	1,30
Valence O N° 2123	0,15	10,7	2,5	0,06 - 0,37	2,10	1,55	0,25	6,4	1,6	0,16 - 0,40	1,75	1,40
Mono A N° 5240	0,15	10,7	2,3	0,07 - 0,35	2,60	1,75	0,06	26,7	1,9	0,03 - 0,11	3,10	2,10
Valence A N° 2123	0,27	5,9	2,4	0,11 - 0,66	2,80	1,90	0,07	22,8	1,9	0,04 - 0,13	2,60	1,70
Mono C N° 5338	0,20	8,0	2,0	0,10 - 0,40	2,30	1,50	0,08	20,0	1,7	0,05 - 0,14	2,60	1,70
Valence C N° 2123	0,20	8,0	2,0	0,10 - 0,40	2,30	1,50	0,11	14,5	1,9	0,06 - 0,21	2,50	1,60
Mono A N° 5245	0,20	8,0	2,0	0,10 - 0,40	2,30	1,50	0,05	32,0	1,5	0,03 - 0,07	2,15	1,45
Valence A N° 2125	0,20	8,0	2,0	0,10 - 0,40	2,30	1,50	0,04	40,0	2,3	0,02 - 0,09	3,50	2,60
Mono C N° 5338	0,20	8,0	2,0	0,10 - 0,40	2,30	1,50	0,08	20,0	1,7	0,05 - 0,14	2,60	1,70
Valence C N° 2125	0,15	10,7	2,3	0,07 - 0,35	2,60	1,75	0,18	8,9	1,9	0,09 - 0,34	2,60	1,75

Les DV_{50} des valences des vaccins trivalents sont exprimées en volume de vaccin monovalent ($\frac{1}{3}$ du volume du vaccin trivalent).

(x) Non titré.

Figure N° 11

N.B. Une analyse de variance (4) par ailleurs plus précise, a permis de confirmer entièrement les conclusions précédentes obtenues par application de la méthode de Litchfield.

b) Vaccins trivalents

Les vaccins trivalents sont composés de vaccins monovalents titrés sur bovins et sur cobayes. Leur composition exacte est indiquée au chapitre "Matériel".

Dans nos conditions nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence significative (à p = 0,95) dans la relation dose-effet, c'est-à-dire dans les pentes :

- entre les différents vaccins trivalents analysés valence par valence,
- entre les différentes valences des vaccins trivalents,
- entre les différents vaccins monovalents et les valences correspondantes des vaccins trivalents,
- entre les différents vaccins monovalents et les vaccins trivalents quelle que soit la valence.

La pente moyenne pondérée établie à partir des 10 vaccins monovalents et des 11 valences des trivalents est de 2,10 avec une précision de 1,1 ce qui est tout à fait comparable aux résultats obtenus avec les 23 DVB_{50} des vaccins monovalents.

c) Vaccins monovalents et trivalents

Calculée à partir de 34 DVB_{50} ayant nécessité l'utilisation de plus de 700 bovins, la relation dose-effet, c'est-à-dire vaccin antiaphteux - protection des bovins, est un système de pente moyenne, dans le système de Litchfield: S_m' : 2,15; la précision fS_m' sur cette moyenne est de 1,075.

Les valeurs limites de S_i pour un titrage (à p = 0,95) sont, pour fS_i = 1,51 :

$$\frac{2,15}{1,51} = 1,42 < S_i < 2,15 \times 1,51 = 3,24$$

Autrement dit, dans nos conditions, on a 95 chances sur 100, lors d'un titrage de vaccin sur bovins, d'obtenir un "S" compris dans ces limites. Les pentes S de nos 34 titrages sont d'ailleurs comprises entre 1,6 et 3,1.

2. Relation dose-effet sur cobayes

Dans notre précédente publication, la relation dose-effet avait été établie à partir de 75 essais. L'information étant suffisante, l'étude n'a pas été reprise. La relation dose-effet obtenue avec les vaccins trivalents n'est pas statistiquement différente de celle publiée l'année dernière S_m' = 2,15. Le hasard fait que la valeur S_m' = 2,15 est commune aux relations dose-effet sur bovins et sur cobayes.

3. Comparaison des DVB_{50} des vaccins monovalents et trivalents

L'analyse de variance et la technique des "séries appariées" (5) ont montré qu'il n'y a pas de différence entre les DVB_{50} des vaccins monovalents et trivalents, comparés valence par valence (à p = 0,95).

La corrélation DVB_{50} des monovalents et DVB_{50} des trivalents est hautement significative : r = 0,978 (pour ddl = 9), et l'équation de la droite est : Y = X - 0,07 (Fig. 12).

Par conséquent, la puissance d'un vaccin trivalent pour une valence déterminée, ou sa DVB_{50} exprimée en volume de vaccin monovalent, est pratiquement identique à la puissance ou à la DVB_{50} du vaccin monovalent correspondant.

Cela prouve une nouvelle fois que les résultats du contrôle du vaccin monovalent permettent de prévoir ceux du vaccin trivalent. Dans nos conditions, nous n'avons mis en évidence ni synergie, ni antagonisme entre les différentes valences d'un mélange trivalent (à p = 0,95).

4. Comparaison des DVC_{50} des vaccins monovalents et trivalents

Il n'y a pas de différence significative (p = 0,95) entre les DVC_{50} des vaccins monovalents et les valences correspondantes des vaccins trivalents. Mais, par contre, il y a une différence significative entre valences à p = 0,95.

La corrélation DVC_{50} des vaccins monovalents en DVC_{50} des trivalents est hautement significative : r = 0,890 (pour ddl = 6) et l'équation de la droite est :

$$Y = 0,94\ X + 0,02 \text{ (Fig. 13).}$$

Pratiquement la puissance d'un vaccin trivalent pour une valence donnée ou sa DVC_{50} exprimée en volume du vaccin monovalent, est équivalente à la puissance ou à la DVC_{50} du monovalent.

Cette notion est très importante puisque des résultats de contrôle des vaccins monovalents, on peut prévoir ceux du vaccin trivalent. Comme chez les bovins, sur cobayes (2), nous n'avons mis en évidence ni synergie ni antagonisme entre les différentes valences d'un mélange trivalent (à p = 0,95).

5. Comparaison des DVC_{50} et des DVB_{50}

Compte tenu du fait que la relation dose-effet est commune aux vaccins monovalents et trivalents, et qu'il existe une corrélation entre les valeurs obtenues avec les vaccins monovalents et celles des valences correspondantes des vaccins trivalents, tant sur bovins que sur cobayes nous avons utilisé tous les résultats expérimentaux déjà présentés, ne faisant qu'une étude valence par valence.

Depuis l'an dernier, l'homogénéité accrue de notre production se traduit par des résultats très groupés donnant sur le graphique de corrélation, un nuage de points très resserrés. Cette méthode ne nous ayant pas permis de préciser davantage les normes publiées précédemment, nous avons été amenés à choisir un autre test statistique : les séries appariées (4).

Afin d'augmenter le nombre d'observations et d'affermir nos conclusions, nous avons utilisé également les résultats des contrôles semi-quantitatifs (5 bovins inoculés avec une dose de vaccin et 5 bovins avec 1/4 de dose) après estimation de la DVB_{50} (pour une pente moyenne de 2,15). Dans la valence O, 13 valeurs ont été ainsi estimées et 19 pour chacune des valences A et C. En outre, pour les deux vaccins O no 5 134, 5 135 et les deux vaccins C No 5 329, 5 330 on avait utilisé 5 bovins inoculés avec une dose, 5 bovins avec 1/4 de dose et 5 bovins avec 1/16ème de dose, ce qui a permis de calculer la DVB_{50}. Le nombre de DVB_{50} calculées est ainsi porté à 38, et celui des DVB_{50} estimées est de 48.

La figure No 14 présente pour 26 vaccins O, 30 vaccins A et 30 vaccins C, la différence algébrique entre les log des DVC_{50} et les log des DVB_{50}. Les valeurs des DV_{50} sont exprimées en 1/100ème de ml.

Le test des séries appariées (4) a permis de mettre en évidence une différence systématique et significative entre les valeurs de la DVC_{50} et la DVB_{50} pour les valences O et A. Pour la valence C la différence enregistrée est très faible et n'est pas significative.

CORRELATION ENTRE LA DVB 50 DES VACCINS MONOVALENTS ET CELLE DES VALENCES CORRESPONDANTES DES TRIVALENTS

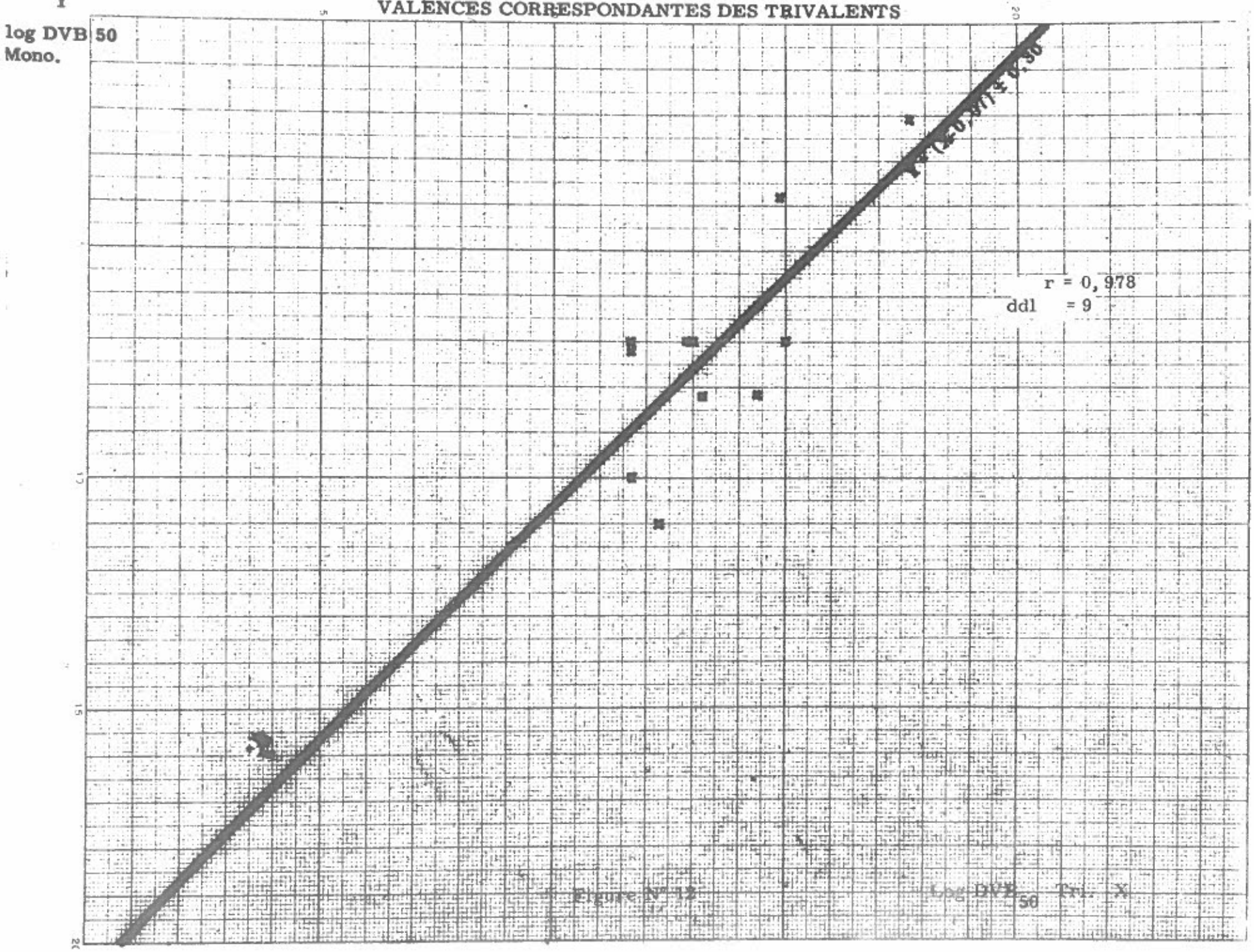


Figure N° 12

CORRELATION ENTRE LA DV C 50 DES VACCINS MONOVALENTS ET CELLE DES VALENCES CORRESPONDANTES DES TRIVALENTS

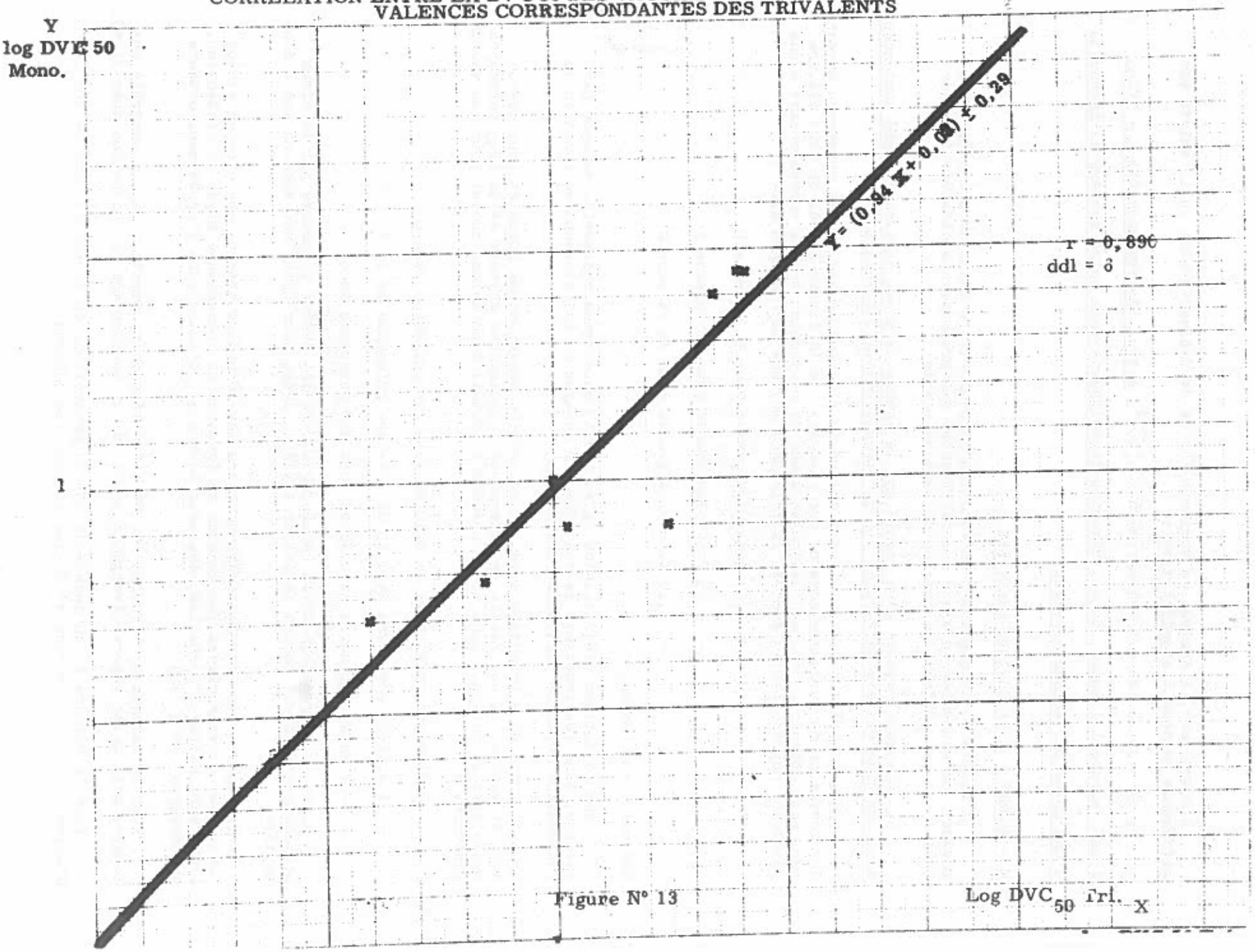


Figure N° 13

D'autre part, l'analyse de variance (5) de ce tableau montre qu'il existe une différence hautement significative :

$F \frac{2}{83} = 30,28$ (ce qui correspond à $p < 10^{-3}$) entre l'équivalence DVB_{50} - DVC_{50} d'une valence à l'autre, ce qui démontre formellement pour notre système la nécessité d'une norme par souche de virus.

E - NORMES - APPLICATIONS PRATIQUES

La figure No 15 présente, en fonction du pourcentage moyen de protection des bovins, les équivalences entre les différentes valeurs moyennes obtenues tant sur bovins que sur cobayes en fonction du type de vaccin.

La puissance moyenne d'un vaccin est le nombre de doses vaccinantes 50% contenues dans une dose entière de vaccin, tel que le producteur l'a définie.

Selon l'espèce sur laquelle est obtenu le titrage, on parlera de puissance moyenne sur bovins ou de puissance moyenne sur cobayes. De la figure No 14, on peut déduire que, pour obtenir un pourcentage moyen donné de protection bovine correspondant à une puissance moyenne bovine donnée, la puissance moyenne sur cobayes sera :

- 1,67 fois plus petite pour la valence O
- 2,25 fois plus grande pour la valence A
- 1,10 fois plus grande pour la valence C

que celle sur bovins.

Dans le tableau d'équivalence (Fig. No 15) nous avons rassemblé, valence par valence, tous les résultats de contrôle sur cobayes en les classant en fonction du pourcentage moyen de protection sur bovins.

A partir du pourcentage moyen de protection choisi comme norme et pour chaque type de vaccin, il est facile de déterminer la puissance moyenne et la DV_{50} correspondante chez le cobaye. Dans notre précédent travail nous avions choisi pour les vaccins monovalents :

- O Flandres, une norme de 0,40 ml soit une puissance de 4,0
- A Allier, une norme de 0,15 ml soit une puissance de 10,7
- C Vosges, une norme de 0,30 ml soit une puissance de 5,3.

Ainsi le pourcentage moyen de protection bovine contre l'épreuve par le virus homologue n'était-il jamais inférieur à 97% au 22ème jour après une vaccination à dose entière.

De façon à vérifier la cohérence entre les résultats obtenus sur cobayes et sur bovins, nous avons classé les vaccins en fonction du pourcentage moyen de protection, d'une part estimé d'après les résultats bovins et, d'autre part d'après ceux obtenus sur cobayes (Fig. 16).

Pour la valence O, 1 vaccin sur 26 a été légèrement avantagé par le contrôle sur cobaye, mais cette légère divergence porte sur un pourcentage de protection très élevé.

Pour la valence A, au-dessus de 95% de protection, on trouve 27 vaccins sur 30 d'après le contrôle bovins et 29 sur 30 pour les cobayes.

DIFFERENCE ENTRE $\log DVC_{50} - \log DVB_{50}$

- ANALYSE STATISTIQUE

Valence O Flandres		Valence A Allier 1960		Valence C Vosges 1960	
N° vaccin	Différence $DVC_{50} - DVB_{50}$ en log	N° vaccin	Différence $DVC_{50} - DVB_{50}$ en log	N° vaccin	Différence $DVC_{50} - DVB_{50}$ en log
1105 (I)	- 0,13	5220	- 0,50	1317	- 0,10
1105 (II)	+ 0,08	5224	+ 0,15	5319	- 0,22
1118	+ 0,09	5226	+ 0,23	5320	+ 0,22
1119 (I)	0	5227	- 0,25	5322	- 0,40
1119 (II)	+ 0,04	5228	0	5324	- 0,20
5131	- 0,20	5233	- 0,38	5338	- 0,45
5132 (I)	+ 0,77	5240	- 0,33	5329	- 0,32
5132 (II)	+ 0,70	5245	- 0,65	5330	+ 0,15
5140	+ 0,15	2102	- 0,30	2102	- 0,15
5134	+ 0,13	2123	- 0,58	2123	- 0,26
5135	+ 0,13	2125	- 0,60	2125	+ 0,12
2102	+ 0,19	1210	- 0,54	1307	- 0,08
2123	+ 0,22	1212	- 0,74	1308	0
1109	+ 0,03	1213	- 0,59	1309	- 0,34
1110	+ 0,20	1217	- 0,55	1313	+ 0,20
1111	+ 0,26	1218	- 0,49	5325	- 0,19
5124	- 0,19	1219	- 0,39	5332	- 0,30
5139	+ 0,06	5221	- 0,30	5334	- 0,54
1108	+ 0,40	5230	- 0,67	5335	- 0,34
1116	+ 0,51	5234	- 0,74	5336	- 0,23
1117	+ 0,43	5235	- 0,55	1311	+ 0,10
1120	+ 0,14	5236	- 0,89	1312	+ 0,40
1122	+ 0,14	5237	- 0,49	1315	+ 0,05
5128	+ 0,60	5239	+ 0,07	1316	- 0,10
5137	+ 0,54	1208	- 0,10	5326	+ 0,40
5141	+ 0,56	1209	+ 0,10	5327	+ 0,28
		1211	- 0,20	5328	+ 0,28
		1216	- 0,10	5331	+ 0,28
		5231	- 0,30	5333	+ 0,10
		5238	+ 0,10	5337	+ 0,25
N = 26		N = 30		N = 30	
Moyenne des différences (en log)		Moyenne des différences (en log)		Moyenne des différences (en log)	
+ 0,225	± 0,10 *	- 0,35	± 0,11 *	- 0,046	± 0,09 *
t = 4,36		t = 6,46		t = 0,95	
Significativité: $p < 10^{-4}$		Significativité: $p < 10^{-8}$		Non significatif	
Rapport arithmétique					
$1\ DVC_{50} = 1,67\ DVB_{50}$		$1\ DVC_{50} = \frac{DVB_{50}}{2,25}$		$1\ DVC_{50} = \frac{DVB_{50}}{1,11}$	
Puissance moyenne bovine = puissance moyenne cobaye x 1,67		Puissance moyenne bovine = puissance moyenne cobaye x $\frac{1}{2,25}$		Puissance moyenne bovine = puissance moyenne cobaye x $\frac{1}{1,11}$	

* Limites à p = 0,95 de la moyenne des différences exprimées en log

Figure N° 14

TABLEAU D'EQUIVALENCE

VALEURS SUR BOVINS				RESULTATS SUR COBAYES								
Pourcentage moyen de protection des bovins	Puissance moyenne sur bovins (S_m'=2,15)	DVB_{50} en ml de vaccin		Valence O Flandres			Valence A Allier 1960			Valence C Vosges 1960		
		Mono. à 1,6ml la dose entière	Tri. à 5 ml la dose entière	Puissance moyenne sur cobayes (S_m'=2,15)	DVC_{50} en ml de vaccin		Puissance moyenne sur cobayes (S_m'=2,15)	DVC_{50} en ml de vaccin		Puissance moyenne sur cobayes (S_m'=2,15)	DVC_{50} en ml de vaccin	
					Mono. à 1,6 ml la dose	Tri. à 5 ml la dose		Mono. à 1,6 ml la dose	Tri. à 5 ml la dose		Mono. à 1,6 ml la dose	Tri. à 5 ml la dose
99,4	7,0	0,23	0,71	4,2	0,38	1,19	15,8	0,10	0,31	7,7	0,21	0,65
97	4,2	0,38	1,18	2,5	0,64	2,00	9,5	0,16	0,52	4,6	0,35	1,09
95	3,5	0,46	1,43	2,1	0,76	2,38	7,9	0,20	0,63	3,9	0,41	1,28
90	2,7	0,59	1,85	1,6	1,00	3,12	6,1	0,26	0,81	3,0	0,53	1,66
85	2,2	0,73	2,27	1,3	1,23	3,84	5,0	0,32	1,00	2,4	0,67	2,08
80	1,9	0,84	2,63	1,1	1,45	4,54	4,3	0,37	1,16	2,1	0,76	2,38
70	1,5	1,07	3,33	0,9	1,77	5,55	3,4	0,47	1,47	1,7	0,94	2,94
$<$70	$<$1,5	$>$1,07	$>$3,33	$<$0,9	$>$1,77	$>$5,55	$<$3,4	$>$0,47	$>$1,47	$<$1,7	$>$0,94	$>$2,94

Nous rappelons que ces équivalences ne sont valables que pour les souches suivantes : O Flandres
A Allier 1960
C Vosges 1960

Figure N° 15

Les vaccins No 5 220 et 2 067, valence A, protègent les bovins à 90% d'après les titrages sur ces animaux, et à 95% d'après l'unique titrage sur cobayes.

Pour le No 1 213, seule l'estimation sur bovins a été faite.

En définitive, le nombre de divergences observées est parfaitement en accord avec le risque statistique d'erreur que nous acceptons (5 sur 100).

Afin d'obtenir à dose entière chez les bovins un pourcentage moyen de protection contre le virus homologue voisin du 100% biologique (puissance bovine moyenne : 7), nous nous proposons d'utiliser les normes suivantes sur cobayes :

- Valence O Flandres : puissance moyenne sur cobayes : 4,2 soit une DVC_{50} inférieure à 0,38 ml pour le vaccin monovalent à 1,6 ml, et inférieure à 1,20 ml pour le vaccin trivalent à 5 ml.

- Valence A Allier 1960 : puissance moyenne sur cobayes : 15,8 soit une DVC_{50} inférieure à 0,10 ml pour le vaccin monovalent à 1,6 ml, et inférieure à 0,31 ml pour le vaccin trivalent à 5 ml.

- Valence C Vosges 1960 : puissance moyenne sur cobayes : 7,7 soit une DVC_{50} inférieure à 0,21 ml pour le vaccin monovalent à 1,6 ml, et 0,65 ml pour le vaccin trivalent à 5 ml.

Ces normes sont valables uniquement pour les 3 souches citées ci-dessus. Pour le virus O Lausanne 1965, par exemple, l'établissement de ces normes est en cours et elles seront vraisemblablement différentes de celles de O Flandres.

F - DISCUSSION

1. Changement de l'intervalle de dilution chez le cobaye

Nous avons été amenés à ce changement dans le but de réduire le nombre de cobayes par titrage. Cependant il faut remarquer que cette économie de 20% se traduit par une légère augmentation de fD, c'est-à-dire une faible diminution de la précision : le fD moyen de 1,7 est passé à 1,8. Dans nos conditions, ce risque était acceptable.

2. Pouvoir séparateur

Le pouvoir séparateur Δ m d'un système est fonction de sa variance s^2. Pour une probabilité de 0,95, le log du pouvoir séparateur est égal à $2\sqrt{2\,s^2}$.

Connaissant fD on peut déduire s par la relation :

$$s = \sqrt{\frac{\log fD}{2}}$$

Pour le cobaye, avec un fD moyen de 1,8, le pouvoir séparateur moyen (à p = 0,95) sera de 2,3.

Pour le bovin, la valeur du fD moyen passe de 2 à 2,1. Le pouvoir séparateur moyen (à p = 0,95) passe de 2,7 à 2,9.

3. Contrôle des vaccins trivalents sur cobayes

Notre expérience actuelle est encore faible, et il est possible que pour la valence O, nous soyons conduits à modifier la gamme des dilutions.

TABLEAU COMPARATIF DE L'ESTIMATION DES POURCENTAGES

MOYENS DE PROTECTION DES BOVINS A L'AIDE DES DVB_{50} et des DVC_{50}

Pourcentage moyen de protection des Bovins	Puissance moyenne sur bovins	Valence O Flandres		Valence A Allier 1960		Valence C Vosges 1960	
		Contrôle Cobayes	Contrôle Bovins	Contrôle Cobayes	Contrôle Bovins	Contrôle Cobayes	Contrôle Bovins
$>$ 99,4	$\geqslant$ 7,0	22	21	22	22	25	25
97 à 99,4	4,2	4	5	6	3	4	4
95 à 96,9	3,5			1	2	1	1
90 à 94,9	2,7				1		
85 à 89,9	2,2				1		
80 à 84,9	1,9						
70 à 79,9	1,5				1		
$<$ 70	$<$ 1,5			1			

Figure N° 16

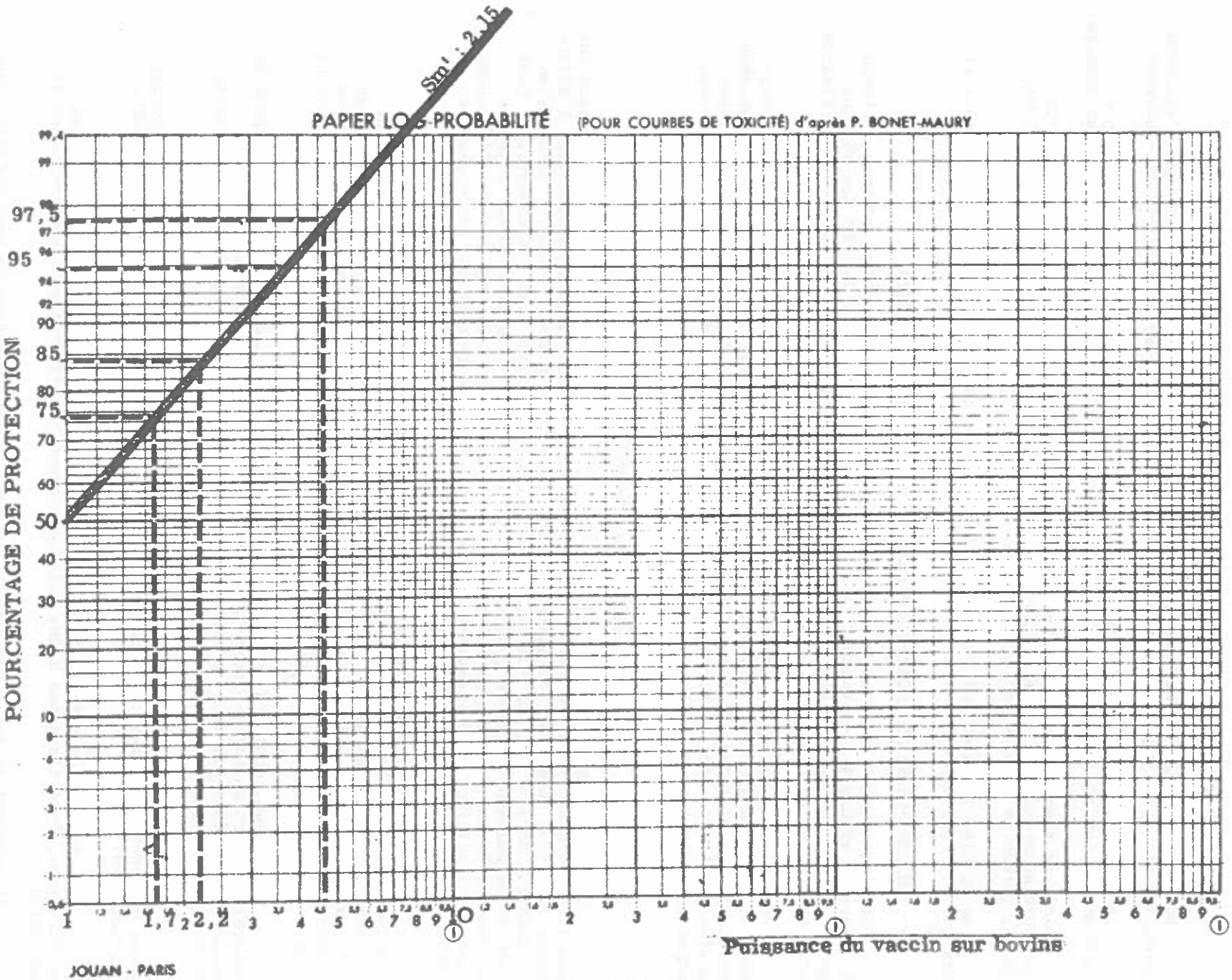

PAPIER LOG-PROBABILITÉ (POUR COURBES DE TOXICITÉ) d'après P. BONET-MAURY
Sm' : 2,15
POURCENTAGE DE PROTECTION
97,5
95
85
75
50
1,7
2,2
Puissance du vaccin sur bovins
JOUAN - PARIS

FIGURE N° 17

4. Cas aberrants

En 1965, nous avions obtenus 3 cas aberrants sur 47 observations, ce qui d'ailleurs pouvait être expliqué par les risques statistiques (5%) comme nous allons le confirmer.

Le vaccin O No 5 132 a été "récupéré" au deuxième titrage sur bovins (DVB_{50} = 0,08 ml au lieu de 0,05 ml, ce qui n'est pas statistiquement différent du premier titrage).

Pour le vaccin A No 5 233, la DVB_{50} avait été estimée à 0,75 ml à partir d'un contrôle semi-quantitatif défectueux; le titrage complet sur bovin a donné 0,15 ml, ce qui permet de "récupérer" cette valeur.

Le dernier cas aberrant enfin, était en bordure des limites de la corrélation, il n'a pas été répété.

5. Estimation du pourcentage minimum de protection des bovins

Nous savons que la "pente" moyenne du système vaccin antiaphteux-réponse du bovin à l'épreuve virulente, provoquant la généralisation aux 4 pieds de 100% des témoins, est de l'ordre de 2,15. Dans ces conditions la puissance du vaccin doit être suffisante pour obtenir un pourcentage minimum donné de protection bovine.

Pour un pourcentage minimum de 85%, il est clair que la puissance du vaccin doit être au moins de 2,2 (Fig. No 17). Compte tenu du fait que l'erreur moyenne du système bovin est fD = 2,1, dans le moins favorable des cas (à p = 0,95) la puissance moyenne bovine devra donc être au moins de 2,2 x 2,1 = 4,6 ce qui correspond à un pourcentage moyen de protection de 97,5.

CONCLUSIONS GENERALES

Un système de contrôle d'activité sur bovins et sur cobayes du vaccin antiaphteux inactivé est décrit. Il consiste, dans des conditions expérimentales définies, à déterminer le nombre de doses vaccinantes 50% pour le cobaye contenues dans la dose bovine de vaccin. De cette valeur qui exprime la puissance moyenne pour les cobayes, on peut déduire la puissance moyenne pour les bovins, et par suite le pourcentage moyen de protection bovine. Un animal est protégé lorsqu'après inoculation du virus d'épreuve, dans des conditions expérimentales données, il résiste à l'infection généralisée au pieds.

Au cours de ces expériences on a été amené à préciser la relation "dose de vaccin-réponse des bovins" et le pouvoir séparateur moyen (à p = 0,95) qui est de 2,9 pour les bovins et de 2,3 pour les cobayes. Tant sur cobayes que sur bovins on n'a pas pu mettre en évidence de phénomènes de concurrence ou de synergie entre les différentes valences d'un vaccin trivalent par rapport aux vaccins monovalents entrant dans sa composition (à p = 0,95).

Ce système, dont les normes ont été précisées, est utilisé depuis un an pour le contrôle courant de notre production de vaccin monovalent. Les conclusions des expériences présentées dans ce travail nous autorisent à l'utiliser pour le contrôle du vaccin trivalent.

Cette technique de titrage d'activité du vaccin inactivé nous permet d'aborder toute une série d'études immunologiques : variantes, comparaison de vaccins expérimentaux, etc.

Sous réserve de vérifications périodiques sur bovin, qui demeurera l'animal de référence, nous disposons d'une solution économique et précise à nos problèmes de contrôles.

Il convient de souligner que les "normes cobaye" publiées ne sont valables dans nos conditions expérimentales que pour les souches O Flandres - A Allier 1960 - C Vosges 1960. Pour toute nouvelle souche une grille d'équivalence devra être établie dans le même esprit.

BIBLIOGRAPHIE

1 - MACKOWIAK C., FONTAINE J., TERRE J., STELLMANN C., ROUMIANTZEFF M., PETERMANN H.G.

Contrôle quantitatif du vaccin anti-aphteux. Etude de la loi dose-effet et corrélation entre les doses vaccinantes 50 pou 100 chez les cobayes et les bovidés.

Réunion Commission Européenne de lutte contre la Fièvre Aphteuse, F.A.O., Lyon 28 septembre - 1er octobre 1965.
Bull. O.I.E., 65, 1966, p. 131-171

2 - MACKOWIAL C., LANG R., PETERMANN H.G., ROUMIANTZEFF M., FONTAINE J., STELLMANN C.

Contrôle quantitatif du vaccin anti-aphteux. I. Titrage des anticorps neutralisants chez lex cobayes vaccinés.

Rev. Med. Vet., 116, 1965, p. 497-507.

3 - ROUMIANTZEFF M., FONTAINE J., STELLMANN C., MACKOWIAK C.

Contrôle quantitatif du vaccin anti-aphteux. II. Détermination de la dose vaccinante 50% chez le cobaye.
Rev. Med. Vet., 116, 1965, p. 597-608.

4 - SCHWARTZ D.

Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.
Paris, Ed. Médicales Flammarion, 1963.

5 - STELLMANN C., TERRE J., ROUMIANTZEFF M., BORNAREL P.

Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. III. Analyse statistique par la méthode de Litchfield.
Rev. Med. Vet., 116 , 1965, p. 609-615.

6 - STELLMANN C., TERRE J.

Choix d'une méthode de calculs statistiques en vue des contrôles d'activité des produits biologiques sur animaux.
Bull. Soc. Sci. Vet., Lyon, 67, 1965, p. 273-282.

7 - TERRE J., BORNAREL P., STELLMANN C., SOULEBOT J.P.

Contrôle quantitatif du vaccin anti-aphteux - Détermination de la dose vaccinante 50% chez le bovin.
Rec. Med. Vet. Alfort, 141, 1965, p. 1109-1130.

ANNEXE 2

RAPPORT PRELIMINAIRE SUR L'EMPLOI DE LAPINS POUR ESSAYER LES VACCINS ANTIAPHTEUX INACTIVES

par R.H. Fagg*

De nombreux chercheurs ont essayé d'utiliser de petits animaux pour contrôler l'efficacité des antigènes aphteux inactivés en vue du remplacement des tests courants effectués sur des bovins. Mackowiak et ses collaborateurs ont présenté, à la dernière réunion de la Commission européenne de lutte contre la fièvre aphteuse, une communication relative à un test où les vaccins sont essayés sur des cobayes, le résultat obtenu sur ces animaux étant utilisé ensuite pour évaluer l'efficacité des vaccins chez les bovins. Une telle méthode n'est applicable que si l'on n'emploie que quelques souches de virus pour produire le vaccin et si le rapport entre l'efficacité sur les cobayes et celle sur les bovins peut être déterminé pour chaque souche. Lorsqu'il est nécessaire de produire un vaccin à partir de nombreuses souches différentes pour pouvoir lutter contre plusieurs foyers d'infection dans diverses parties du monde, une telle méthode ne peut avoir qu'une portée limitée.

Plusieurs chercheurs ont démontré que le lapin répond au virus inactivé de la poliomyélite et que les anticorps qu'il forme sont proportionnels à la quantité d'antigènes inoculés. On sait aussi que le lapin réagit au virus aphteux et forme des anticorps même sans être atteint de la maladie. On a donc pensé qu'il pourrait être possible d'utiliser le lapin pour contrôler les vaccins antiaphteux inactivés, les résultats étant évalués au moyen du taux d'anticorps formés par l'animal.

La présente communication a pour objet de décrire certains des facteurs qui influencent la réponse du lapin aux antigènes inactivés et de la comparer à celle des bovins.

MATERIEL ET METHODES

Le vaccin a été préparé à base du virus O, de souche Israël 1/63, du 9ème au 12ème passage sur culture de tissu d'épithélium lingual, et inactivé avec 0,05 pour cent d'acétyléthylèneimine à 25°C, à un pH de 7,6, 48 heures avant d'être absorbé à l'hydroxyde d'aluminium. Son innocuité a été déterminée par titrage d'échantillons pendant l'inactivation et par inoculation du produit inactivé sur des souriceaux avant l'adjonction d'hydroxyde d'aluminium (Fagg, 1965). Une quantité égale d'hydroxyde d'aluminium a ensuite été ajoutée pour compléter le vaccin. Des dilutions de vaccin ont ensuite été préparées dans un vaccin fictif ne contenant pas de virus, chaque dilution contenant la même quantité d'hydroxyde d'aluminium.

Les lapins provenaient de différents élevages et, sauf les exceptions mentionnées, étaient tous de jeunes adultes de 6 à 9 mois. Sauf dans les cas où l'on a voulu faire des comparaisons entre différentes races, toutes les expériences ont été effectuées sur des lapins de Hollande pesant 3 à 4 livres. Ils étaient logés individuellement ou par paires dans des cages dont le sol était en treillis métallique et nourris à base d'une alimentation composée spéciale, complétée par du foin, du fourrage vert et de l'eau à volonté.

---

* Animal Virus Research Institute, Pirbright, Angleterre.

Cinq ml de vaccin ont été inoculés par voie intramusculaire sur un membre postérieur des animaux. Des échantillons de sang ont été prélevés sur une veine marginale de l'oreille avant la vaccination et à intervalles après celle-ci. Le sang a été incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis a +4°C pendant la nuit. Le sérum a été décanté, centrifugé pour éliminer tout dépôt, puis stocké à une température de +4°C jusqu'au moment où il a été contrôlé.

Le taux d'anticorps neutralisants des sérums a été testé au moyen du test sur souris, du test de réduction de plaques sur couches monocellulaires de BHK et du test d'inhibition métabolique sur culture de tissus. Les sérums soumis aux tests sur souris et de réduction de plaques ont été dilués à 1:5 dans une solution physiologique tamponnée sur phosphate, de pH 7,2-7,4, et inactivés pendant 30 minutes à 56°C. 0,5 ml d'une dilution virale appropriée a été ajouté à 0,5 ml de sérum inactivé, à raison de 5 dilutions virales par sérum. Le mélange sérum-virus a été soumis pendant 30 minutes à une température de 37°C, puis soit titré sur 20 souriceaux de souche 'P' âgés de 6 jours par échantillon de sérum, soit déposé en plaques sur couches monocellulaires de BHK dans des boîtes de Petri de 6 cm, à raison de 10 couches monocellulaires par échantillon. Les couches monocellulaires ont été incubées à nouveau pendant 30 minutes à 37°C, puis recouvertes d'un milieu de gélose semi-liquide. Les plaques ainsi obtenues ont été interprétées 48 heures plus tard. Du sérum de lapins normaux provenant d'animaux témoins a été ajouté chaque fois et les résultats ont été exprimés en tant que différence de titre en logarithme à base 10 entre le sérum de témoin et le sérum testé. Le test d'inhibition métabolique sur culture de tissus a été décrit en 1961 par Martin et Chapman.

RESULTATS

Avant de pouvoir poursuivre les travaux, il a fallu démontrer que le lapin était capable de répondre à l'antigène aphteux inactivé de façon quantitative, soit en déterminant la quantité d'anticorps formés. Une série de dilutions doubles de vaccin a été préparée et inoculée aux lapins, à raison de deux lapins par dilution. On a inclus des lapins témoins auxquels on a inoculé une dilution simple seulement. Des prélèvements en série ont permis d'observer chez les animaux un accroissement rapide des anticorps, mis en évidence vers le quatrième jour après la vaccination et culminant entre le 21ème et le 28ème jour (Graphique 1).

Le taux d'anticorps est maintenu pendant plus de 56 jours. On a observé une réponse quantitative linéaire à l'antiène dans des sérums prélevés à 10, 21, 28 et 35 jours (Graphique 2).

Comme il n'est pas facile d'obtenir des lapins de même race, sexe et âge en nombre suffisant, il a fallu effectuer des expériences préliminaires pour déterminer la différence de réponse selon la race, l'âge et le sexe.

Réponse individuelle

La réponse d'un groupe uniforme de lapins à un antigène commun a été étudiée en inoculant du vaccin à 24 lapins mâles et en leur prélevant du sang 10, 21 et 28 jours plus tard. Les anticorps ont été soumis au test sur souris. En analysant les résultats, on a trouvé une déviation type de 0,36, 0,41 et 0,42 respectivement pour chaque prélèvement, avec des erreurs types de 0,064, 0,066 et 0,062. Il semble par conséquent que les lapins réagissent assez uniformément à l'antigène inactivé. Au cours de cette expérience et dans un autre cas encore, l'un des lapins n'a pas réagi à l'antigène, et n'a formé que peu ou pas d'anticorps. On n'a pas déterminé si cela était imputable aux inoculations de vaccin ou à l'animal même.

Variations dues au sexe ou à l'âge

Pour déterminer toute différence de réponse due à l'âge et au sexe du lapin, des groupes de lapins de 3-4 mois, 8-9 mois et 12 mois et plus ont été vaccinés avec une dose unique d'antigène inactivé. Des échantillons de sérum ont été prélevés pour déterminer la réponse en anticorps au moyens du test sur souris 10 jours après la vaccination. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence notable entre l'un quelconque des groupes d'âge (Tableau 1). Les résultats ont également été analysés pour déterminer s'il y avait les différences de réponse entre les deux sexes (Tableau 2). Aucune différence sensible n'a été observée. Alors que, comme il est indiqué ci-après, il a été nécessaire d'utiliser une race type pour obtenir des résultats comparables, il ne semble pas indispensable que tous les animaux soient du même sexe ou du même âge.

Variations dues à la race

De jeunes lapins adultes de quatre races ont été examinés pour déterminer leur réaction à un antigène inactivé commun. Les races utilisées étaient la race naine des Flandres, d'un poids variant entre 2 et 3 livres, hollandaise, de 3½ à 4 livres, le lapin blanc de Nouvelle-Zélande, 8 à 10 livres et le lapin de Californie, 7 à 8 livres. Des prélèvements de sang en série ont été effectués après la vaccination et les résultats (test sur souris) analysés (Tableau 3). On a observé une différence importante de la réponse suivant les races. C'est la race naine des Flandres qui répond le mieux, suivie par le lapin blanc de Nouvelle-Zélande, le lapin hollandais et le californien. Il est donc important, pour que les résultats d'un test soient comparables avec ceux d'une autre expérience, d'utiliser des lapins d'une seule race et provenant si possible d'un même élevage. Les lapins nains des Flandres n'étaient pas disponibles en nombre suffisant pour la suite des travaux et la taille du lapin blanc de Nouvelle-Zélande pose des problèmes de place pour un nombre aussi élevé d'animaux. Etant donné que la réponse du lapin hollandais est encore assez bonne, bien qu'inférieure à celle des deux autres races, que sa taille est satisfaisante et qu'il est facile à obtenir, c'est cette race qui a été choisie pour tous les travaux consécutifs.

Comparaison des tests d'efficacité entre bovins et lapins

Pour pouvoir comparer les résultats des contrôles d'efficacité chez les bovins avec les résultats obtenus sur les lapins, 6 vaccins préparés par diverses méthodes ont été expérimentés sur des bovins, à raison d'une dose sous-cutanée de 15 ml, et sur des lapins à raison d'une dose intramusculaire de 5 ml. Des prélèvements ont été effectués sur les deux espèces à plusieurs intervalles après la vaccination et les bovins ont été testés 20 jours plus tard par la méthode intradermolonguale courante.

Les vaccins testés étaient identiques, sauf en ce qui concerne la technique d'inactivation appliquée. Aucune différence importante n'a été trouvée entre les six vaccins au cours de l'un quelconque des tests effectués soit sur les bovins, soit sur les lapins.

La dose protectrice moyenne de vaccin à 50 pour cent était de 0,28 ml. Pour les bovins ayant reçu la dose protectrice à 50 pour cent, le taux d'anticorps du sérum, révélé par le test sur souris, était de 1,0, tandis qu'il était de 1/19 dans le test coloré. Pour les lapins ayant reçu la dose protectrice bovine à 50 pour cent, le taux d'anticorps était de 1,75 dans le test sur souris et de 1/11 dans le test coloré.

On a observé un rapport linéaire entre les anticorps produits par les bovins et ceux formés par les lapins en réponse au même antigène (Graphique 3).

CONCLUSIONS

Il a été démontré que le lapin répond à l'antigène aphteux inactivé proportionnellement à la quantité inoculée. Pour que les expériences futures puissent être comparées, il sera essentiel d'avoir recours à des animaux d'une race unique dont le choix dépendra des disponibilités en espace ou en animaux. Pour les lapins d'une même race, le sexe et l'âge ne semblent pas devoir influencer la réponse.

La quantité d'anticorps formés par le lapin en réponse à l'antigène inactivé est proportionnelle à celle qui est formée par les bovins en réponse au même antigène. Etant donné que le taux d'anticorps correspondant à la protection des bovins est connu, soit plus de 1/45 dans le test coloré, il est possible de déterminer quel est le taux d'anticorps formé par le lapin qui correspond à celui qui est nécessaire pour assurer la protection des bovins. Par conséquent, à condition qu'un vaccin, lorsqu'il est inoculé à des lapins, donne lieu à une réponse en anticorps supérieure à un minimum déterminé, on peut affirmer qu'un tel vaccin est capable de protéger des bovins contre un virus virulent. Il est donc possible de concevoir l'utilisation du lapin pour évaluer rapidement l'efficacité des vaccins antiaphteux inactivés lorsqu'il n'est pas possible d'avoir recours aux contrôles courants d'efficacité sur les bovins mêmes.

Il est intéressant de noter la différence de corrélation entre la réponse en anticorps des bovins d'une part et des lapins d'autre part si le taux d'anticorps est déterminé par deux tests de neutralisation différents, à savoir le test sur souris et le test coloré. La réponse en anticorps des lapins a toujours été d'environ 1 log supérieure à celle des bovins lorsqu'elle est déterminée par le test de neutralisation sur souris. Dans le test coloré, cette différence est inversée, une partie importante des anticorps contenus dans le sérum du lapin n'étant pas mise en évidence par ce test (Graphique 4).

Les résultats communiqués jusqu'à présent ne s'appliquent qu'à une seule souche de virus. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour déterminer s'il existe une corrélation similaire avec d'autres types de virus entre lapins et bovins. Les résultats obtenus jusqu'à présent justifient la poursuite de recherches relatives à l'utilisation des lapins pour le contrôle des vaccins inactivés.

REFERENCES

Fagg, R.H. (1965). Report to the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Lyon, September 1965.

Lucam, F., et al. (1964). Rev. Med. Vet., CXV, 225

Mackowiak, C., et al. (1965). Rev. Med. Vet., 116, 497.

Martin, W.B. et Chapman, W.G. (1961). Res. Vet. Sci. 2, 53.

Roumiantzeff, M., et al. (1965). Rev. Med. Vet., 116, 597.

Uhr, J.W. (1964). Science, 145, 457.

TABLEAU 1. Incidences de l'âge sur la réponse des lapins à l'antigène aphteux inactivé

Age :	3 - 4 mois		8 - 9 mois		12 mois +	
	Réponse en anticorps :					
	x'	$(x')^2$	x''	$(x'')^2$	x'''	$(x''')^2$
	2,62	6,8644	1,87	3,4969	2,25	5,0625
	1,12	1,2544	2,62	6,8644	1,62	2,6244
	2,25	5,0625	2,5	6,2500	2,5	6,2500
	2,25	5,0625	2,37	5,6169	1,37	1,8769
	2,5	6,2500	2,25	5,0625	2,62	6,8644
	2,5	6,2500	2,0	4,0000	1,75	3,0625
	2,37	5,6169	2,37	5,6169	2,84	8,0656
	2,5	6,2500	2,0	4,0000	2,37	5,6169
	2,12	4,4944	2,5	6,2500	1,12	1,2544
	2,87	8,2369	2,62	6,8644	2,37	5,6169
	2,37	5,6169	2,25	5,0625	2,37	5,6169
			2,12	4,4944	2,37	5,6169
T	25,57		27,47		25,55	
$\bar{x}$	2,3155		2,2892		2,1292	
$\sum x^2$		60,9589		63,5789		57,5283

$\sum 1$ = somme des carrés = 182,0661

$\sum 2 = T'\bar{x}' + T''\bar{x}'' + T'''\bar{x}'''$ = 176,2612

$\sum 3 = \bar{x}$ = 176,1785

$msq_W = (\sum 1 - \sum 2)/(N - k)$ = 0,1814

$msq_B = (\sum 2 - \sum 3)/(k - k)$ = 0,04135

Taux de variance $F = \frac{msq_B}{msq_W} = \frac{0,04135}{0,1814} = 0,228$. Insignifiant.

TABLEAU 2. Incidences du sexe sur la réponse des lapins à l'antigène aphteux inactivé

Femelles		Mâles	
Réponse en anticorps x'	$(x')^2$	Réponse en anticorps x''	$(x'')^2$
		2,5	6,2500
2,62	6,8644	2,37	5,6169
1,12	1,2544	2,5	6,2500
2,25	5,0625	2,12	4,4944
2,25	5,0625	2,87	8,2369
2,5	6,2500	2,37	5,6169
1,87	3,4969	2,37	5,6169
2,62	6,8644	2,0	4,0000
2,5	6,2500	2,5	6,2500
2,37	5,6169	2,62	6,8644
2,25	5,0625	2,25	5,0625
2,0	4,0000	2,12	4,4944
2,25	5,0625	2,84	8,0656
1,62	2,6244	2,37	5,6169
2,5	6,2500	1,12	1,2544
1,37	1,8769	2,37	5,6169
2,62	6,8644	2,37	5,6169
1,75	3,0625	2,37	5,6169
Totaux (T) 36,46		42,03	
$\bar{x}$ 2,1447		2,3350	
$\sum x^2$	81,5252		100,5409

$\sum 1$ = somme des carrés = 182,0661

$\sum 2 = T'\bar{x}' + T''\bar{x}''$ = 176,3358

$\sum 3 = \bar{x}\,T$ = 175,8098

$msq_W = (\sum 1 - \sum 2)/(N - k)$ = 0,1791

$msq_B = (\sum 2 - \sum 3)/(k - 1)$ = 0,5260

Taux de variance F — Taux de variance $F = \frac{msq_B}{msq_W}$ = 2,937 Insignifiant.

TABLEAU 3. Analyse de la variance de la réponse des différentes races de lapins à l'antigène aphteux inactivé

	Nain des Flandres		Hollandais		Blanc de Nouv.Zél.		Californien	
	x'	$(x')^2$	x''	$(x'')^2$	x'''	$(x''')^2$	x''''	$(x'''')^2$
	3,25	10,5625	3,37	11,3569	3,24	10,4976	2,34	5,4756
	3,13	9,7969	2,37	5,6169	3,24	10,4976	2,5	6,2500
	3,62	13,1044	3,25	10,5625	3,12	9,7344	1,37	1,8769
	3,62	13,1044	2,37	5,6169	3,75	14,0625	3,25	10,5625
	4,75	22,5625	3,12	9,7344	3,5	12,2500	2,5	6,2500
	4,25	18,0625	0,75	0,5625	3,84	14,7456	3,5	12,2500
	3,13	9,7969	2,34	5,4756	2,0	4,0000	2,12	4,4944
	2,50	6,2500	1,50	2,2500	2,34	5,4756	2,37	5,6169
	2,62	6,8644	2,84	8,0656	2,0	4,0000	1,62	2,6244
	2,37	5,6169	1,00	1,0000	1,25	1,5625	2,37	5,6169
	3,00	9,0000	1,75	3,0625	3,25	10,5625	2,37	5,6169
	3,25	10,5625	0,50	0,2500	2,37	5,6169	2,37	5,6169
	2,34	5,4756	1,50	2,2500	2,37	5,6169	1,84	3,3856
	2,37	5,6169	0,75	0,5625	2,0	4,0000	1,62	2,6244
	2,37	5,6169	2,37	5,6169	2,62	6,8644	1,62	2,6244
			1,00	1,0000			0,50	0,2500
			0,50	0,2500			1,25	1,5625
			2,37	5,6169			0,50	0,2500
Totaux	46,57		33,65		40,89		36,01	
$\sum \bar{x}$	3,11		1,87		2,73		2,00	

$$\sum 1 = (x'_1)^2 + (x'_2)^2 \ldots\ldots (x'_i) + (x'_2)^2 + \ldots\ldots (x'_i)^2$$

$$+ (x'_2)^2 \ldots\ldots x_n^2$$

$$= 433,2782$$

$$\sum 2 = \bar{x}'T' + \bar{x}''T'' + \bar{x}'''T''' + \bar{x}''''T''''$$

$$= 144,8327 : 62,9255 + 111,6297 + 72,0200$$

$$= 391,4079$$

$$\sum 3 = \bar{x}T, \text{ où } \bar{x} = T/N$$

$$= 2,43 \times 157,12$$

$$= 383,3728$$

/...

Légende du Tableau 3

Dans les échantillons, le carré moyen = $msq_W = (\xi_1 - \xi_2)/(N - k)$

où k = nombre total d'échantillons, N = nombre d'observations

$= (433,2782 - 391,4079)/66 - 4$

avec N - k degrés de liberté = $v^2 = 62$

$= 0,6153$

Entre les échantillons, le carré moyen = $msq_B = (\xi_2 - \xi_3)/(K - 1)$

avec K - 1 degrés de liberté = $v^1 = 3$

$= (391,4079 - 383,3728)/3$

$= 2,6784$

Taux de variance = $F = msq_B/msq_W$

$= 2,6784/0,6153$

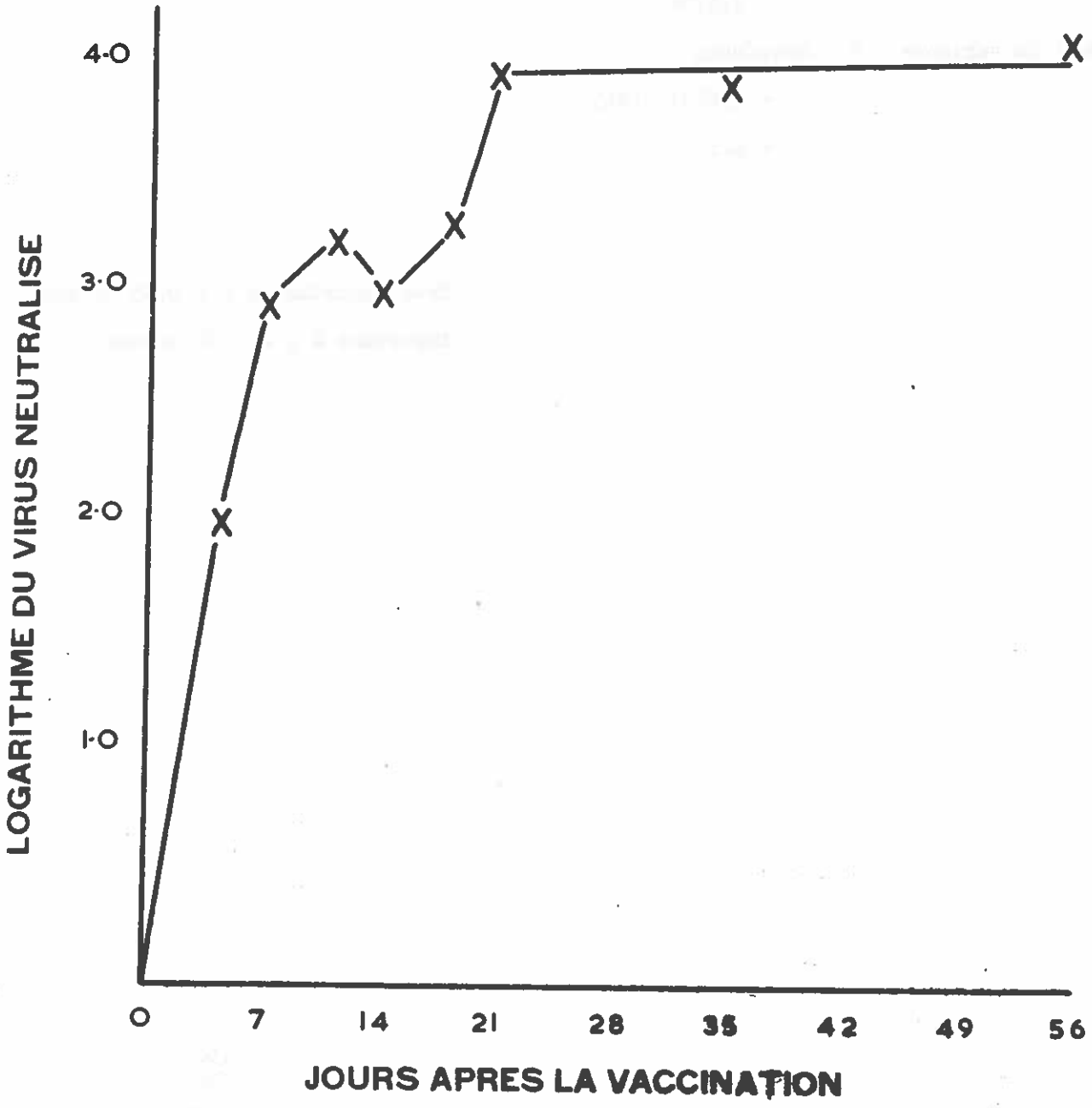
$= 4,35$

Très important à p = 0,05 niveau

Important à p = 0,01 niveau

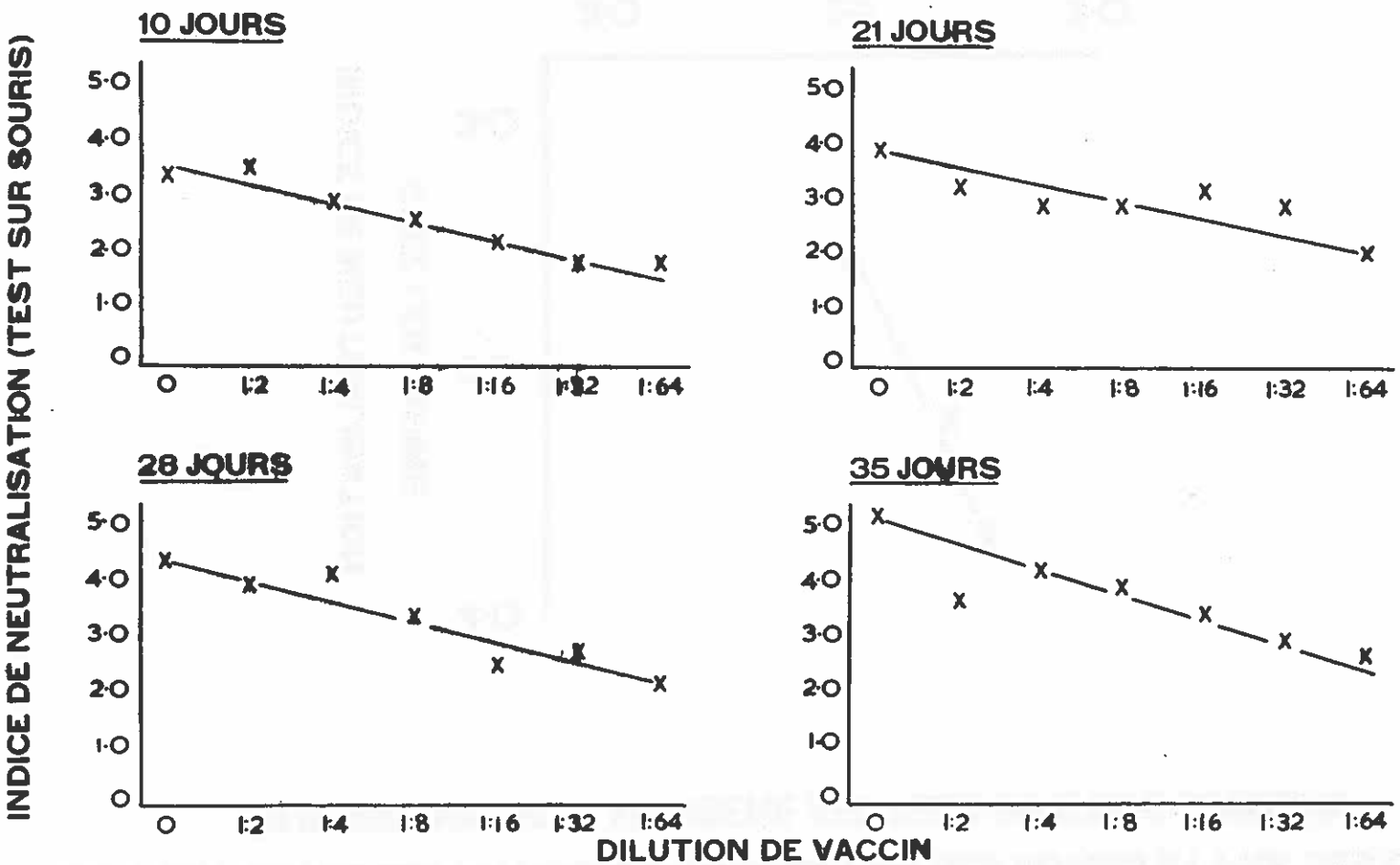
GRAPHIQUE 1

AUGMENTATION DES ANTICORPS NEUTRALISANTS DANS LE SERUM DE LAPIN APRES VACCINATION A L'ANTIGENE APHTEUX INACTIVE



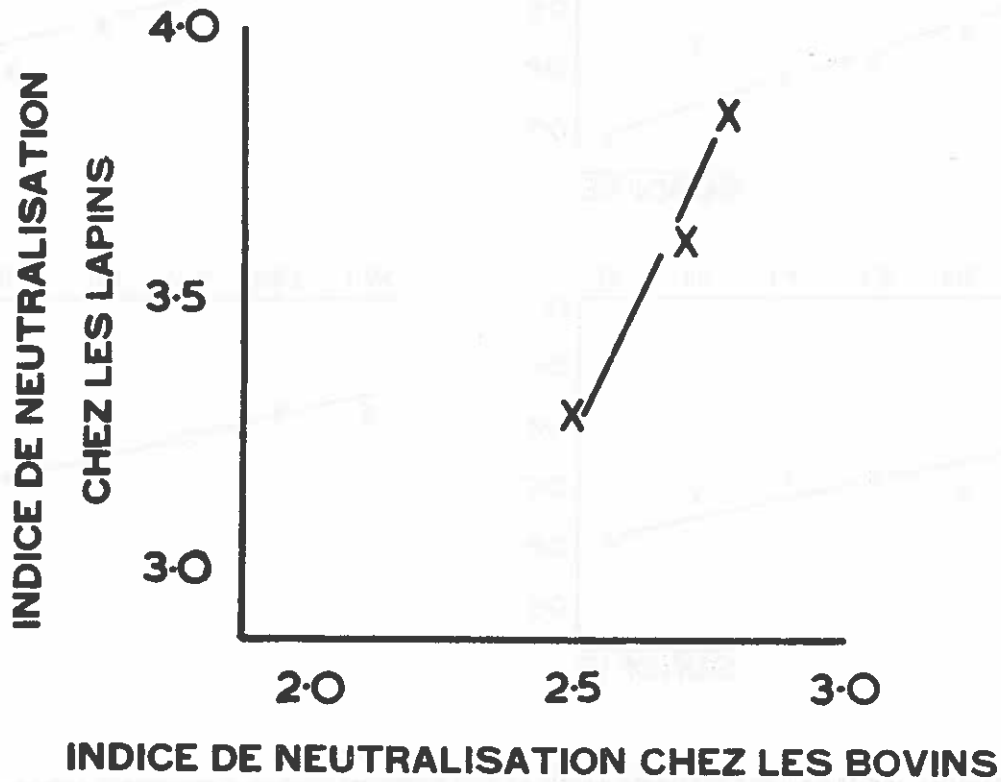
GRAPHIQUE 2

INDICES DE NEUTRALISATION DE SERUMS DE LAPINS PRELEVES SUR DES ANIMAUX VACCINES AVEC DES DOSES PROGRESSIVES D'ANTIGENE APHTEUX INACTIVE



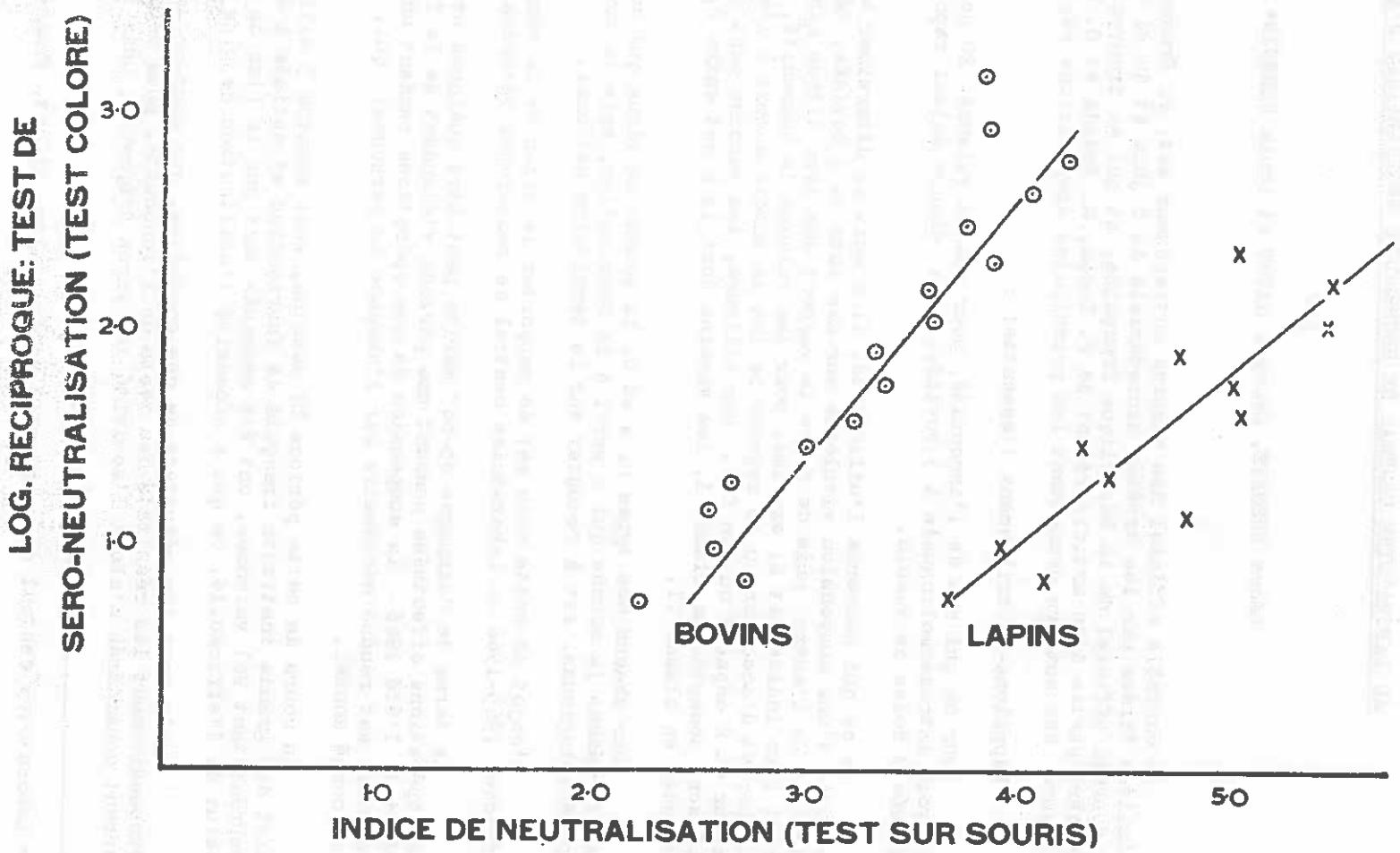
GRAPHIQUE 3

RAPPORT ENTRE LES ANTICORPS FORMES PAR DES BOVINS ET PAR DES LAPINS EN PRESENCE D'UN ANTIGENE APHTEUX INACTIVE COMMUN



GRAPHIQUE 4

RAPPORT ENTRE LE TEST DE NEUTRALISATION SUR SOURIS ET LE TEST COLORE EFFECTUES AVEC DES SERUMS DE BOVINS ET DE LAPINS



ANNEXE 3

BILAN D'UNE CAMPAGNE DE CONTROLE OFFICIEL DE VACCINS ANTIAPHTEUX AU LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES VETERINAIRES D'ALFORT

par

Léone DHENNIN, Georges GAYOT et Louis DHENNIN*

Le contrôle officiel des vaccins antiaphteux est, en France, réalisé selon les modalités fixées par les arrêtés ministériels du 8 juin et du 24 décembre 1965 publiés au Journal officiel de la République française, et qui se trouvent reproduits dans la première partie d'un article récent de F. Lucam, M. Fedida et G. Dannacher où par ailleurs ces auteurs commentent les principales dispositions règlementaires prises.

Rappelons-en brièvement l'essentiel :

Pour ce qui est de l'innocuité, pour chaque valence, 20 points sont injectés par voie intradermolinguale à 3 bovidés, puis chaque animal reçoit par voie sous-cutanée 3 doses de vaccin.

En ce qui concerne l'efficacité, il s'agit de déterminer valence par valence le titre d'une suspension virulente sur des lots de 4 bovidés, témoins d'un côté, vaccinés de l'autre, puis de faire le rapport des deux titres ainsi obtenus. On arrive ainsi à un indice dit K, exprimé, pour des raisons de commodité, en logarithmes, et qui permet d'accepter ou de rejeter le lot de vaccin soumis à l'examen selon que la valeur du K dépasse ou non 0,6. Par ailleurs, les vaccins dont le K est supérieur à 1,2 sont acceptés en classe I, les vaccins dont le K est entre 0,6 et 1,2 sont acceptés en classe II.

Pour chacun des types O, A et C, la souche de virus qui sert à l'épreuve n'est pas forcément la souche qui a servi à la fabrication, mais la souche qui, pour des raisons épidémiologiques, est à redouter sur le territoire national.

L'objet de cette note est de rapporter le bilan de la campagne de contrôle officiel 1965-1966 au Laboratoire central de recherches vétérinaires.

Le terme de "campagne 65-66" mérite peut-être quelques explications; il désigne les opérations effectuées pendant une période s'étendant de la fin de l'été 1965 au début de l'été 1966. La suspension de ces opérations pendant une partie de la période estivale est rendue nécessaire par l'absence du personnel qui, à cette époque, prend son congé annuel.

Au cours de cette période 87 vaccins, soit environ 5 millions de doses, provenant des grands instituts français de fabrication et estimés à être commercialisés, représentant 261 valences, ont été examinés tant sur le plan de l'innocuité que sur celui de l'efficacité, ce qui a nécessité l'utilisation de plus de 1 500 animaux.

Quels sont les résultats de ces contrôles, que peut-on en dire? Nous examinerons successivement les résultats des tests de l'innocuité, puis ceux de l'efficacité où seront considérés d'abord l'activité des virus d'épreuve, puis les valeurs de K.

---

* Laboratoire central de recherches vétérinaires, Alfort, France

Les tests d'innocuité

Les 87 vaccins trivalents examinés se sont révélés bactériologiquement stériles et aucun des 1 740 points d'inoculation intradermolinguale n'a révélé la présence de virus aphteux.

Par ailleurs, aucune réaction alarmante ou excessive et à plus forte raison toxique n'a suivi l'injection sous-cutanée des 3 doses. A l'estimation selon laquelle aucun des 1 740 points examinés ne s'est révélé virulent, il est tentant de donner un intervalle de confiance.

Cet intervalle de confiance à 95% est nul, autrement dit le fait que l'échantillon des 1 740 points injectés soient négatifs apporte une certitude quasi absolue que la "population" des vaccins dont est extrait l'échantillon est bien inoffensive, sous réserve, bien entendu, que l'échantillon soit représentatif.

Les tests d'efficacité

Les virus : Le titre moyen de chacun des types de virus sur les animaux témoins calculé selon la méthode de Reed et Münch exprimé au 1/10 de ml est le suivant :

O : 7,20

A : 7,14

C : 7,18

Les titres sont manifestement, en moyenne, les mêmes pour chacun des types et ils sont suffisamment élevés pour les besoins des épreuves.

Si, par ailleurs, on calcule la variance de ces estimations moyennes qui portent sur 23 titrages pour chaque valence, on trouve :

variance de O = 0,31

" A = 0,52

" C = 0,24

Le rapprochement de ces chiffres indique que si les variances de O et de C sont assez voisines l'une de l'autre, il n'en est pas de même pour le virus A, qui montre une tendance à la dispersion nettement plus grande, sans toutefois que les tests de comparaison soient significatifs.

Les valeurs de K :

Pour chacune des valences vaccinales, les moyennes et les variances calculées sur les 87 échantillons sont les suivantes :

Valeur de K		Variance de K
O	2,97	0,37
A	2,81	0,68
C	2,94	0,41

L'examen des valeurs moyennes de l'indice de protection fait apparaître tout d'abord qu'ils sont très élevés, se rapprochant de la valeur 3,00, ou mieux encore que le taux de protection contre l'inoculation de 10 000 DI 50 est, selon les travaux de F. Lucam, M. Fedida et G. Dannacher, de l'ordre de 98%.

Lorsque ces mêmes valeurs de K sont comparées entre elles par analyse de variance, on constate que, avec F = 1,32 NS les différences observées ne sont pas statistiquement significatives et en conséquence peuvent être, en l'absence de preuve contraire, considérées comme égales.

Mais si par ailleurs, il est procédé à la comparaison des variances, on arrive à la conclusion que la variance de la valence A est significativement différente des variances des valences C et O, ce qui amène à dire que les valeurs de K sont, pour la valence A plus dispersées que pour les valences O et C. A ces expressions algébriques, il est possible de donner une représentation graphique peut-être plus parlante en construisant les histogrammes représentant les distributions des valeurs de K pour les différentes valences.

La figure ci-jointe montre ces représentations où l'échelle de classe a été intentionnellement choisie être de 0,6 et à partir de la valeur zéro.

On y voit que pour la valence O, la distribution est très centrée et a une allure symétrique évoquant très fortement la distribution normale.

Pour la valence A les valeurs sont un peu plus dispersées et l'histogramme est une excellente représentation de la distribution normale.

Pour la valence C les résultats sont également très centrés et bien que l'histogramme revête au premier abord un aspect particulier semblant montrer une légère asymétrie, un examen plus poussé montre que la normalité peut être raisonnablement admise.

Enfin, la superposition des histogrammes montre, par ailleurs, que les moyennes sont les mêmes pour les 3 valences.

CONCLUSIONS

L'analyse des 261 valeurs de K montre que la production du vaccin antiaphteux répond aux normes que l'on attend d'une production industrielle de qualité : une distribution symétrique, harmonieuse, des différentes valeurs, sans pics et sans à-coups.

Les valeurs moyennes obtenues sont élevées et correspondent à un taux de protection contre 10 000 DI 50 de l'ordre de 98%.

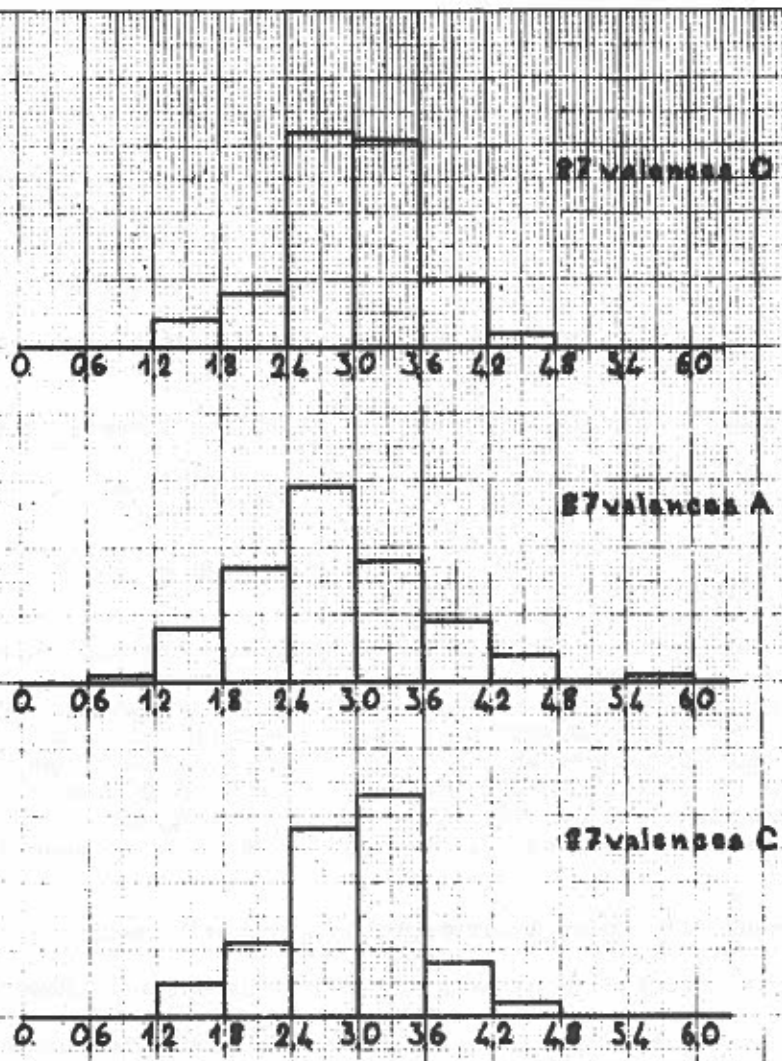
Sans être préoccupante, et sans que sa variance plus élevée puisse être assimiliée à une hétérogénéité, la valence A, pour laquelle une telle disparité avait déjà été constatée, par le titre des virus d'épreuve, doit peut-être faire l'objet d'une attention plus particulière.

En conclusion, on peut dire que l'ensemble des 87 vaccins examinés au cours de la campagne 1965-1966 s'est montré être de très haute qualité.

(Laboratoire central de recherches vétérinaires d'Alfort : Directeur : Docteur A. Lucas).

BIBLIOGRAPHIE

F. Lucam, M. Fedida et G. Dannacher
Bull. O.I.E., 1966, 65, (3-4), 385-418.



Histogrammes représentatifs des valeurs de K

ANNEXE 4

NOTE SUR LES CULTURES DE CELLULES BHK 21 POUR LA PRODUCTION A GRANDE ECHELLE DE VIRUS APHTEUX

par

B. Ubertini, L. Nardelli, A. Dal Prato, G. Panini et S. Barei *

La plupart de tous les vacoins antiaphteux inactivés actuellement disponibles sont produits selon l'une des méthodes ci-après :

1. Virus récolté sur langues infectées de bovins vivants (virus naturel);

2. Virus cultivé sur fragments survivants d'épithélium lingual de bovins infectés (virus de culture Frenkel);

3. Virus propagé sur culture de cellules rénales de bovins ou de porcins (virus de culture rénale).

Chacune de ces trois méthodes permet de préparer des vacoins efficaces.

Ces trois sources de virus sont toutefois limitées par le nombre de bovins adultes ou jeunes (veaux) et de porcins disponibles dans les abattoirs. Cette limitation revêt une grande importance en cas de propagation rapide d'une nouvelle souche de virus aphteux. Il est donc hautement souhaitable de pouvoir recourir à une méthode de production de virus non tributaire des abattoirs. A cette effet, on pourrait produire des virus à grande échelle sur des cellules BHK 21 selon la méthode mise au point à Pirbright.

Les recherches effectuées à Birbright ont permis d'établir que :

1. Les cellules BHK 21 sont sensibles au virus aphteux (Mowat et Chapman, 1962);

2. Ces cellules se développent en culture en suspension profonde (Capstick, Telling, Chapman et Stewart, 1962);

3. Ces cellules, cultivées et infectées en suspension, produisent des antigènes de virus aphteux (Capstick, Garland, Chapman et Masters, 1965);

4. La cancérogénicité de ces cellules est limitée exclusivement aux hamsters et est uniquement le fait de la cellule viable intacte (Capstick et Garland, 1965; Kane, Pay et Bracewell, 1965). Deeble et Heymann (1965) ont confirmé tous ces résultats.

En dehors des recherches précitées, d'autres travaux ont donné des résultats favorables quant à la culture du virus aphteux sur cellules BHK 21. Rivenson et Segura (1963), ainsi que Polatnick et Bachrach (1964), ont publié des articles sur l'emploi de couches monostratifiées de cellules BHK 21 dans des tubes roulants pour la production de virus aphteux. Amighi (1964), Nottebohm et ses collaborateurs (1964), Bengelsdorff et Schneider (1964), et Schneider, Jaeger et Bengelsdorff (1964) ont produit des vaccins antiaphteux inactivés efficaces à partir de virus obtenus sur couche monostratifiée de cellules BHK 21.

---

* Istituto zooprofilattico sperimentale, Brescia, Italie

Plus récemment, Mammerickx et Leunen (1966) ont réussi à cultiver à grande échelle du virus aphteux sur des assises monocellulaires de BHK 21 dans des flacons roulants, ainsi qu'à produire des vaccins efficaces avec de tels virus.

Il y a plus de trois ans, nous avons entrepris à notre Institut des recherches sur la culture de lignées cellulaires de BHK 21 et sur la possibilité de les utiliser pour produire des vaccins antiaphteux. Nous estimons que le moment est maintenant venu de faire état des résultats de nos expériences.

En premier lieu, nous désirons préciser que notre technique s'inspire de la méthode de Pirbright et nous exprimons notre gratitude aux techniciens de l'Institut de Pirbright qui ont bien voulu nous conseiller.

Le présent rapport traite de la culture en suspension profonde de cellules BHK dans des cuves de 150 litres, de la culture de cellules BHK dans des flacons tournants, de la production de virus aphteux sur couche monocellulaire et en suspension cellulaire profonde, ainsi que sur le contrôle de l'efficacité des vaccins et de leur innocuité (cancérogénicité).

MILIEU DE CULTURE

1. Milieu pour culture immergée

Il s'agit du milieu décrit par Telling et Elsworth (1965).

2. Supplément en acides aminés et en tryptose

Le supplément utilisé est celui qu'à décrit Capstick (1963).

3. Milieu pour cultures en couche monocellulaire en flacons roulants

Le milieu de culture utilisé est fondamentalement identique à celui décrit par Polatnick et Bachrach (1964), avec les modifications suivantes :

a) Les vitamines sont remplacées par la solution vitaminée du milieu de Telling et Elsworth au taux de 50 pour cent;

b) Le bouillon de phosphate de tryptose (Difco) est remplacé par le bouillon à la trypticase-soja (BBL);

c) pH = 7,5.

4. Milieu d'entretien pour les couches monocellulaires

Solution d'Earle + 0,5 pour cent d'hydrolysat de lactalbumine (NBC) + 0,1 pour cent d'extrait de levure (NBC); pH 7,5.

5. Milieu d'entretien pour les cultures immergées

On utilise le même milieu que celui décrit pour l'entretien des cultures submergées, sans sérum ni Edifas B 50.

6. Antibiotiques

Les antibiotiques suivants sont ajoutés par litre de milieu : Bacitracine, 2 500 U.; Colimycine 200 000 U.; Néomycine (base) 100 mg: Mycostatine, 25 000 U.

STOCKAGE DES CELLULES BHK DANS DE L'AZOTE LIQUIDE

Les cellules mères d'ensemencement sont préparées à partir de cultures en suspension de cellules précocement repiquées et maintenues à -196°C avec du diméthylsulfoxyde à 5 pour cent (Doughtery, 1962; Porterfield et Ashwood-Smith, 1962; Panina et Dal Prato, 1965).

Les cellules sont conservées dans des ampoules de 1 ml (Wheaton 6201-843), chacune de celles-ci contenant environ 3 x 10^6 cellules. Cette technique permet aux cellules de demeurer vivantes pendant au moins deux ans. L'équipement est fabriqué par Linde-Union Carbide Co.

REACTIVATION DES CELLULES BHK CONGELEES ET PREPARATION D'UNE NOUVELLE CULTURE EN SUSPENSION

Cinq ampoules de cellules congelées sont rapidement décongelées, diluées dans 50 ml de milieu pour culture en couche monocellulaire et servent ensuite à ensemencer une boîte de Roux. Après 24 heures d'incubation, le milieu est changé. Trois ou quatre jours plus tard, on obtient une couche monostratifiée comptant environ 80 x 10^6 cellules, qui est ensuite trypsinisée. Les cellules sont centrifugées et servent à ensemencer un flacon à agitation magnétique de 1 500 ml, le volume de la culture étant de 400 ml. Les cellules sont soumises, au moyen d'aimants recouverts de Téflon, à une agitation entretenue à l'aide d'un dispositif (300 tours/minute) semblable à celui décrit par Smith et Burrows (1963). Notre appareillage diffère en ceci que nous utilisons un bain-marie à 36°C qui peut recevoir 8 flacons. Après la 24ème heure, on ajoute des suppléments d'acides aminés et de tryptose. Les cellules augmentent de sept à huit fois environ en l'espace de trois jours.

Les cellules cultivées en flacons soumis à agitation magnétique sont transférées (sans centrifigation) dans un fermentateur de 5 litres. A l'aide de transferts en série dans de tels fermentateurs, on obtient les cellules servant à ensemencer le récipient de 150 litres.

Pour les cultures immergées dans les fermentateurs de 5 litres, nous utilisons le Fermentor Model F-05 et le Fermentor Drive Assembly pour trois fermentateurs (New Brunswick Scientific Co.).

Les cultures sont soumises à une agitation de 350 tours/minute et, après 24 heures d'incubation, sont aérées au-dessous de la lame hélicoïdale (350 ml d'air par minute).

Avec cet appareil, aucun système de contrôle automatique du pH n'est nécessaire.

Des suppléments d'acides aminés et de tryptose sont ajoutés après 24 heures d'incubation.

Vers le 3e ou le 4e jour d'incubation, les cellules ont augmenté de 7 à 8 fois dans chaque fermentateur de 5 litres.

Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans la mise en route et l'entretien des cultures en suspension, notamment : 1) le nombre initial de cellules par ml : 2-3 x 10^5 cellules/ml environ est la densité minimum qui permet à la culture de parvenir en un temps raisonnable à la phase de développement logarithmique; 2) contrôle de la stérilité; à tous les stades de la préparation des cellules mères, il faut prélever des échantillons de cultures tissulaires pour en vérifier la stérilité bactérienne.

CULTURE IMMERGEE DANS LA CUVE DE 150 LITRES

Notre cuve de 150 litres est conçue à peu près comme celle de 30 litres décrite par Telling et Elsworth (1965); les seules différences concernent la dimension et la méthode d'agitation.

La cuve mesure 45 cm de diamètre et sa partie cylindrique 110 cm de long; le fond en forme de coupelle à 2 cm de profondeur.

L'agitation est obtenue au moyen d'une lame hélicoïdale (diamètre de la lame 24 cm, distance entre les pales 13 cm) dont la vitesse de rotation est de 150 tours/minute.

La méthode utilisée pour contrôler le pH est identique à celle décrite par Telling et Stone (1964) et Telling et Elsworth (1965), à ceci près que notre équipement est conçu pour 6 cuves. Nous employons un seul pH-mètre industriel de la marque Jonosis (type pH SC), relié à un enregistreur à six bornes (type SP), un indicateur (type RD3aD) avec contact minimum et maximum, 6 chaînes d'électrodes, 2 soupapes de contrôle pour chaque cuve et plusieurs relais auxiliaires. Tous ces instruments sont fabriqués et fournis par la firme SIS (Milan).

Avec une cuve de 150 litres, nous pouvons produire en 4 jours 216 litres environ de suspension cellulaire d'une densité de 2,2 - 2,5 x 10^6 cellules viables /ml. La courbe de croissance dans une cuve de 150 litres est indiquée au tableau 1.

Le cycle de production est le suivant :

Dans la cuve de 150 litres, on verse 100 litres de milieu de culture, puis 8 litres de cellules en suspension d'une densité de 3 x 10^6/ml.

Après 24 heures d'incubation, on ajoute 6 500 ml d'acides aminés et 1 100 ml de bacto-tryptose.

Après 48 heures d'incubation, on retire 106 litres de suspension cellulaire à l'aide d'un système à air stérile en surpression, que l'on remplace par 100 litres de nouveau milieu.

Après 72 heures d'incubation, les mêmes suppléments que précédemment sont ajoutés et, à la 96ème heure, on récolte toute la culture cellulaire (environ 116 litres).

La cuve de 150 litres est ensuite lavée et stérilisée, et un nouveau cycle de production est mis en route avec un inoculum de suspension cellulaire préparé dans les fermentateurs de 5 litres.

Nous recommandons ce processus de production afin d'éviter le problème de contamination bactérienne qui risque de se poser dans le cas des cultures continues en grande cuve.

Comme indiqué plus haut, l'inoculum de cellules pour la culture dans la cuve de 150 litres est préparé dans les fermentateurs au moyen de transferts en série dans des fermentateurs de 5 litres. Ces transferts en série se poursuivent pendant un mois environ, sauf en cas de contamination bactérienne.

PRODUCTION DE VIRUS

A. SUR COUCHES MONOCELLULAIRES EN FLACONS ROULANTS

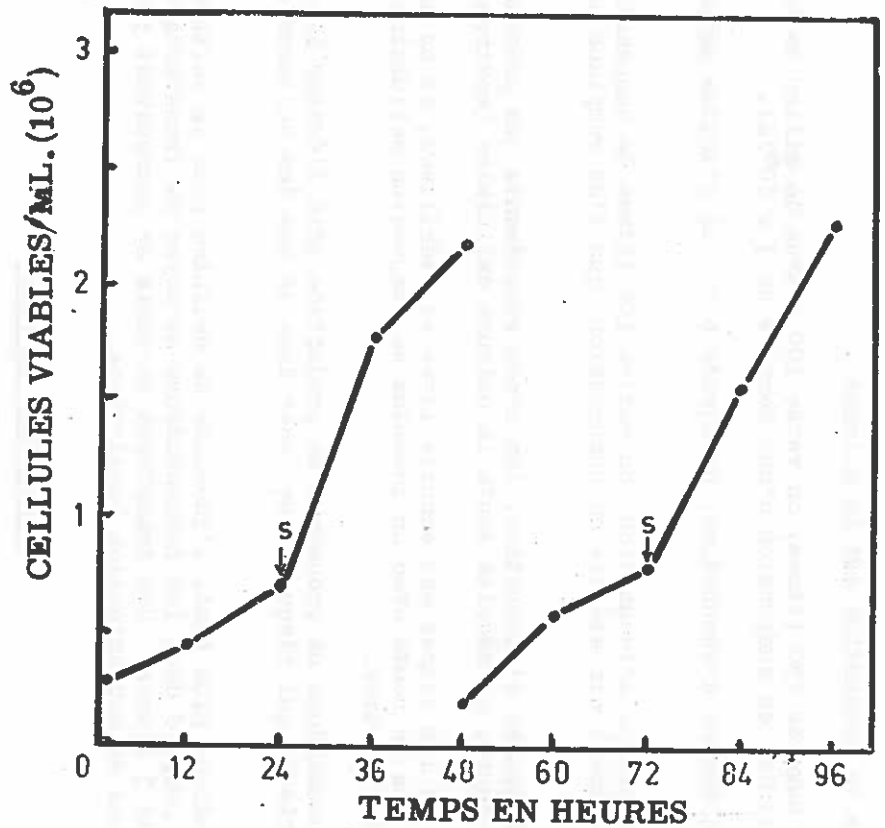
1. Préparation des couches monocellulaires

Les cellules en suspension sont diluées, sans sédimentation ou centrifugation préalables, dans le milieu de culture pour couches monostratifiées, puis ensemencées dans les flacons roulants (Ubertini et al., 1963).

Nous utilisons des cellules qui se trouvent encore dans la phase de développement logarithmique (au maximum 48 heures de croissance en suspension). Dans un flacon de 1 000 ml, on ajoute 200 ml de milieu contenant de 10 à 30 x 10^6 cellules.

TABLEAU 1

COURBE DE CROISSANCE DES CELLULES BHK DANS LA CUVE DE 150 LITRES PENDANT 4 JOURS



LA DIMINUTION DU NOMBRE DE CELLULES A LA 48EME HEURE RESULTE DU PRELEVEMENT DE 106 LITRES DE SUSPENSION CELLULAIRE ET DE L'ADJONCTION DE 100 LITRES DE MILIEU FRAIS

S = SUPPLEMENT D'ACIDES AMINES ET DE TRYPTOSE

En règle générale, la couche monocellulaire atteint un développement satisfaisant en cinq jours avec la quantité la plus faible de cellules et en trois jours avec la quantité la plus élevée.

Pendant la période d'incubation, le milieu de culture n'est pas changé. A la fin de l'incubation, le nombre total des cellules dans chaque flacon est d'environ 250×10^6.

2. Production de virus sur couches monocellulaires

Le milieu de culture est retiré, puis remplacé par 70 ml de milieu d'entretien contenant du virus (adapté après 3 ou 4 repiquages sur cellules BHK) présentant un titre de 0,05 DCT_{50} par cellule.

Après un temps d'incubation variant entre 20 et 24 heures, on recueille le liquide renfermant le virus. A ce moment, la couche monocellulaire est à peu près lysée.

Le virus (types O, A et C) obtenu selon cette technique, présente en général un titre de $10^{-7,6}$/ml chez le souriceau non sevré.

B. PRODUCTION DE VIRUS EN SUSPENSION

Les cellules propagées en culture en suspension profonde sont séparées du milieu de culture par sédimentation pendant deux jours à 4°C dans des flacons de 5 à 10 litres.

Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension par adjonction d'une quantité de milieu d'entretien suffisante pour assurer une concentration d'environ 3×10^6 cellules/ml, puis elles sont infectées avec du virus adapté sur cellules BHK (0,1 DCT_{50} par cellule).

Le virus d'ensemencement est une préparation fraîche obtenue après un repiquage sur couche monostratifiée de cellules BHK.

Après inoculation, les cellules sont maintenues, sous contrôle gazeux automatique du pH, dans un fermentateur de 5 litres ou une cuve de 40 litres de même conception que la cuve de 150 litres décrite plus haut. Les cellules infectées sont maintenues à une température de 36°C et à un pH de 7,6 et sont soumises à une agitation de 150 tours/minute.

La courbe expérimentale de la multiplication du virus est semblable à celle décrite par Capstick, Garland, Chapman et Masters (1965). Après 20 à 30 heures d'incubation, on obtient des titres infectieux (DI_{50} souris) compris entre 10^7/ml et $10^{7,5}$/ml.

MESURE DE L'EFFICACITE DES VACCINS

Les vaccins sont préparés selon notre technique habituelle; les liquides qui renferment le virus sont centrifugés puis traités au chloroforme, adsorbés sur hydroxyde d'aluminium et inactivés au formol (0,05 pour cent) à 25°C pendant 48 heures. Le nombre de DI_{50} de virus contenues dans 1 ml de vaccin est indiqué au tableau 2.

Les tests d'efficacité sont effectués sur le cobaye.

Des dilutions de vaccins avec tampon au carbonate-bicarbonate de sodium sont inoculées par voie sous-cutanée à des groupes de 8 cobayes.

Quinze jours après la vaccination, les animaux sont éprouvés par une inoculation intradermique dans le coussinet plantaire d'une patte postérieure avec 10^4 DG_{50} de virus homologue adapté aux cobayes après 7 repiquages. La DP_{50} est calculée selon la méthode de Reed et Muench.

Les résultats sont indiqués au tableau 2.

Tableau 2 : Efficacité des vaccins antiaphteux inactivés préparés à partir de différentes sources de virus

Sources de virus	DI_{50}/ml *	DP_{50}/ml **
1. Couches monostratifiées de cellules BHK en flacons roulants	7,50	0,048
2. Cellules BHK en cultures en suspension profonde (mélange de 8 lots vaccinaux différents). Virus récolté 20 heures après l'infection.	7,18	0,062
3. Comme ci-dessus, le virus étant récolté 30 heures après l'infection	6,97	0,028
4. Cellules BHK en cultures en suspension profonde. Virus récolté 20 heures après l'infection.	7,18	0,071
5. Comme ci-dessus, le virus étant récolté 30 heures après l'infection	6,95	0,076
6. Méthode de Frenkel	7,55	0,085
7. Couche monostratifiée de cellules rénales de veau en flacons roulants.	7,15	0,062

* = Log. 10 DI_{50} (souris)/ml de vaccin

** = Dose de vaccin protégeant 50 pour cent des cobayes.

Les données de ce tableau permettent de conclure à la possibilité de préparer des vaccins avec les virus produits sur des cellules BHK (couches monocellulaires en flacons roulants ou en suspension) aussi bons que les vaccins préparés avec des virus cultivés selon la méthode de Frenkel ou sur couches monostratifiées de cellules rénales de veau.

TESTS D'INNOCUITE (CANCEROGENICITE)

Le fait que les cellules BHK 21 viables intactes peuvent provoquer des tumeurs chez le hamster syrien (Defendi, Lehman et Kramer, 1963; Tamar, Gotlieb, Stematsky et Reni Shilo, 1964; Hale et al., 1965) nous a amené à nous demander s'il était possible d'utiliser ces cellules pour produire du vaccin.

On dispose maintenant de quelques données bien établies à ce sujet.

Capstick et Garland (1965) ont déclaré que les cellules viables ne pouvaient provoquer des tumeurs que chez le hamster. Aucun effet cancérogène n'a été observé chez les autres animaux inoculés (bovins, ovins, porcins, rats, lapins, cobayes et souris).

Kane, Pay et Bracewell (1965) ont confirmé que des doses élevées de cellules BHK 21 (10^8) n'exercent aucun effet sur les bovins au cours d'une période de 16 semaines. Ils ont également démontré que du vaccin antiaphteux modifié vivant, préparé à partir de cellules BHK, ne provoque pas l'apparition de tumeurs chez le hamster.

Ils signalent qu'environ 5 millions de doses de vaccin inactivé préparé avec du virus obtenu sur cellules BHK ont été administrées à des bovins. Aucun signe d'association entre les cellules BHK 21 et des néoplasies n'a été observé chez les animaux vaccinés. Keeble et Heymann (1965) n'ont pas réussi à provoquer des tumeurs chez le hamster par inoculation de cellules BHK traitées avec de la bêta-propiolactone et avec du virus de la maladie de Newcastle préparé sur cellules BHK et inactivé avec de la bêta-propiolactone.

Afin d'étudier la question de plus près, on a essayé de provoquer des tumeurs chez le hamster syrien selon les procédés suivants :

1. Cellules BHK viables intactes. Des cellules cultivées en suspension ont été centrifugées et remises en suspension dans du milieu d'Eagle pour obtenir, dans un inoculum de 1 ml, le nombre des cellules indiqué dans le tableau 2 (entre 10 et 10 millions).

2. Extraits exempts de cellules BHK. Des couches monocellulaires (3×10^8 cellules) avec 10 ml de milieu d'Earle plus 0,5% de lactalbumine ont été congelées (-30°C) et décongelées à trois reprises. Après centrifugation, le surnageant a été filtré sur une membrane MF Millipore du type HA. Le filtrat a été inoculé non dilué aussi bien que dilué au 1/10 et au 1/100 (dans du milieu d'Earle + 5% de lactabulmine).

3. Cellules BHK formolées. Des cellules (6×10^6/ml), en suspension dans du milieu d'Eagle tamponné au glycocolle afin d'ajuster le pH à 8,2, ont été traitées avec du formol (concentration finale 0,05%) et maintenues à 25°C pendant 44 heures. Cette suspension cellulaire a été inoculée non diluée ainsi que diluée au 1/10.

4. Cellules BHK chloroformées. Des cellules (6×10^6/ml) en suspension dans du milieu d'Eagle, ont été traitées à 5°C avec du chloroforme à 1,2% pendant 1 heure, centrifugées, remises en suspension dans du milieu d'Eagle, puis traitées avec du chloroforme à 0,8% pendant 14 heures, centrifugées et remises en suspension dans le même volume de milieu d'Eagle qu'au début.

5. Virus inactivé préparé sur cellules BHK. Le virus a été cultivé sur couche monocellulaire en flacons roulants (250 x 10^6 cellules par flacon). On a ajouté une certaine quantité de milieu d'entretien, ainsi que du virus d'ensemencement de manière à obtenir, dans 1,5 ml, le virus libéré par 18 x 10^6 cellules. Le virus a été traité avec du chloroforme à +5°C (à 1,2% pendant 1 heure et à 0,08% pendant 14 heures) et inactivé avec du formol (concentration finale 0,05%) pendant 44 heures à 25°C. Le virus inactivé a été inoculé aussi bien non dilué que dilué au 1/5.

6. Vaccin antiaphteux inactivé. La méthode de préparation consistait à mélanger une partie de virus avec une partie de gel d'hydroxyde d'aluminium, tamponner avec du glycocolle, ajouter du formol jusqu'à concentration finale de 0,05% et conserver le mélange à 25°C pendant 2 jours. Le pH final du vaccin était de 8,2. Le virus a été préparé sur couches monostratifiées de cellules BHK en flacons roulants, traité à 5°C avec du chloroforme (à 1,2% pendant 1 heure et à 0,8% pendant 14 heures), puis centrifugé. L'inoculum vaccinal de 1,5 ml contient le virus libéré par 10^7 cellules BHK.

Les animaux d'expérience étaient des hamsters syriens pesant de 60 à 70 g. On a adopté la méthode d'inoculation par voie sous-cutanée. Les hamsters ont été observés pendant une année. Au cours de cette période, quelques animaux ont succombé, leur décès étant dû à différentes causes. Ces animaux, une fois constatée l'absence de tumeurs, n'ont pas été retenus dans les résultats.

Les résultats sont indiqués au tableau 3.

On peut conclure que seules les cellules BHK 21 intactes viables sont capables de provoquer des tumeurs chez le hamster.

Aucun effet cancérogène n'a été observé avec les cellules BHK 21 formolées ou chloroformées, ni avec leurs dérivés comme les extraits exempts de cellules et les virus inactivés exempts de cellules.

TABLEAU 3

Essais de cancérisation de hamsters syriens avec des cellules BHK 21 et leurs dérivés. Résultats obtenus en un an.

Inoculum	Dose	Nombre de tumeurs positives *
1. Cellules BHK viables intactes	10^1 cellules	0/5
	10^2 "	10/15
	10^3 "	8/14
	10^4 "	17/23
	10^5 "	25/25
	10^6 "	25/25
2. Extrait exempt de cellules BHK (préparé à partir de 30×10^7 cellules/ml)	ml 1 non dil.	0/10
	ml 1 dil. 1/10	0/10
	ml 1 dil. 1/100	0/10
3. Cellules BHK formolées (6×10^6 cellules/ml)	ml 1 non dil.	0/17
	ml 1 dil. 1/10	0/24
4. Cellules BHK chloroformées (6×10^6 cellules/ml)	ml 1 non dil.	0/42
5. Virus aphteux inactivé préparé sur cellules BHK	ml 1,5 non dil.	0/41
	ml 1,5 dil. 1/5	0/17
6. Vaccin antiaphteux inactivé (virus préparé sur cellules BHK)	ml 1,5 non dil.	0/33

* Nombre d'animaux réagissants/nombre d'animaux inoculés.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMIGHI M. (1964) Bull. Off. Int. Epiz. 61, 934-944
2. BENGELSDORFF H.J. and SCHNEIDER B. (1964) Bull. Off. Int. Epiz. 61, 1197-1208
3. CAPSTICK P.B. (1963) Proc. Roy. Soc. Med. 56, 1062-1064
4. CAPSTICK P.B. and GARLAND A.J. (1965) Bull. Off. Int. Epiz. 64, 215-223
5. CAPSTICK P.B., GARLAND A.J., CHAPMAN W.G. and MASTERS R.C. (1965) Nature 205, 1135-1136
6. CAPSTICK P.B., TELLING R.C., CHAPMANN W.C. and DOREEN L. STEWART (1962) Nature 195, 1163-1164
7. DOUGHERTY R. (1962) Nature 193, 550-552
8. GOTLIEB-STEMATSKY T. and SHILO R. (1964) Virology, 22, 314-320
9. HALE J., GOFFE A., TOMLINSON B., INGHAM H., WALLER M. and SELKON J. (1965) Brit., J. Exp. Path., 45, 598-606
10. KANE G.J., PAY T.W.F. and BRACEWELL C.D. (1965) Bull. Off. Int. Epiz. 64, 225-230
11. KEEBLE S.A. and HEYMANN C.S. (1965) Nature 206, 1125-1126
12. MAMMERICKX M. and LEUNEN J. (1966) Bull. Off. Int. Epiz. 65, 337-348
13. MOWAT G.N. and CHAPMAN W.G. (1962) Nature 194, 253-255
14. NOTTEBOHM A., GAGGERO A.C., GOMES I. and CUNHA R.G. (1964) Bull. Off. Int. Epiz. 61, 919-933
15. PANINA G. and DAL PRATO A. (1965) Atti Soc. It. Sc. Vet.
16. POLATNICK J. and BACHRACH H.L. (1964) Appl. Microbiol. 12, 368-378
17. PORTERFIELD J. and ASHWOOD-SMITH (1962) Nature, 193, 548-550
18. RIVENSON S. and SEGURA M. (1963) Rev. Invest. ganaderas 16, 293-299
19. SCHNEIDER B., JAEGER O. and BENGELSDORFF H.J. (1964) Bull. Off. Int. Epiz. 61, 1013-1023
20. TELLING R.C. and STONE C.J. (1964) Biotechnol. Bioeng. VI, 147-158
21. TELLING R.C. and ELSWORTH R. (1965) Biotechnol. Bioeng. VII, 417-434
22. UBERTINI B., NARDELLI L., DAL PRATO A., PANINA G. and SANTERO G. (1963) Zbl. Vet. Med., Reihe B., 10, 93-101

ANNEXE 5

VACCIN ANTIAPHTEUX CONCENTRE PREPARE A PARTIR DE CULTURES CELLULAIRES

par

Girard H.C., Sütcü M., Sentürk M., Okay G.,
Yongu A.D., Bayramoglu O.S., Ünlüleblebici N., Boz C.*, Oral M.

INTRODUCTION

Depuis que la culture de tissu a été utilisée pour reproduire le virus aphteux: Sellers (1), Bachrach et al (2), Peterman et al. (3), Weslen et Dinter (4), Mazzaracchio et al (5), les progrès dans les techniques ont été tels que l'on peut à présent produire du virus à grande échelle : Ubertini et al (6), Bachrach et al (7) et même parvenir à une production industrielle du virus grâce à l'utilisation de flacons roulants : Leunen et al (8,10), Ubertini et al (9) Polatnick et al (11).

Durant cette période, de nombreux chercheurs (voir référence dans Fontanelli et al (12) ont étudié le comportement du virus aphteux au cours de sa multiplication en cultures de couches monocellulaires. Ces études ont dégagé les faits suivants, généralement admis, s'agissant des facteurs importants qui facilitent la culture du virus aphteux :

1) on obtient une fixation plus rapide du virus aux cellules en retardant l'addition du milieu de culture : Sellers (13), Patty et Noroross (14).

2) La limitation du volume de liquide recouvrant les cellules, permet la concentration de l'antigène: Patty et al (14), Ubertini et al (9);

3) en effectuant la culture de virus, en l'absence de sérum, on obtient une meilleure multiplication du virus: Sellers et al (15), Graves (17).

Les premiers essais de protection du bétail avec des vaccins pratiqués à partir de virus aphteux obtenu en culture de couches monocellulaires ont été rapportés par Mazzaracchio et al (17-18) Dinter et Wesselen (19), Armbuster et al (20-21), Ubertini et al (22), Leunen et al (23).

A l'heure actuelle, des vaccins antiaphteux préparés en cultures de tissus sont produits régulièrement dans de nombreux laboratoires et utilisés avec succès pour la prophylaxie de la maladie dans quelques pays. Et on s'accorde, d'une manière générale, pour arrêter la culture de virus dès la lyse cellulaire, après environ 18-24 heures. Cependant, d'une façon générale, les vaccins de culture de tissu doivent être employés à une dose relativement élevée pour être efficaces: 20 ml selon Mazzaracchio et al (18), 30 ml selon Armbuster et al (20), 40 ml selon Ubertini et al (22) (vaccin expérimental), 20 ml selon Leunen et al (23), 15 ml selon Cardassis et al (24). Il est sans aucun doute, comme l'ont montré Ubertini et al (25), possible de réduire le volume de la dose en concentrant le vaccin, mais on doit utiliser une quantité relativement importante de suspension virulente.

D'un autre côté, Randrup (26), Brown et Crick (27) ont montré que les deux composants du virus aphteux 7 mu et 25 mu étaient antigéniques, mais que seul le 25 mu était immunigène. En conséquence, le test de fixation du complément révèle la présence de deux composants sans distinction. Ensuite, Mussgay (28), Brown et Cartwright (29) ont montré que l'arcton 113 était capable d'éliminer le composant mu, sans altérer le composant 25 mu, c'est-à-dire la particule immunigène. En conséquence, le test de fixation du complément de la suspension virulente traitée par l'arcton devient un indice de mesure de la puissance du vaccin: Brown et Newman (30). Appliquant la méthode à l'étude du virus aphteux Asia 1, Girard et al (31) ont trouvé le moyen de produire un vaccin correspondant.

* Laboratoire de la fièvre aphteuse, Etlik, Ankara, Turquie.

Cet article indique l'évolution du composant 25 mu, pendant la multiplication du virus aphteux mesurée par l'antigène traité par l'arcton fixant le complément. En outre, sont décrites des expériences dans lesquelles le virus multiplié en cultures de cellules rénales de veau et recueilli au moment le plus convenable, est transformé en vaccin et éprouvé.

MATERIEL ET METHODES

Virus

Les virus aphteux suivants ont été utilisés:

1) Une souche Moyen-Orient, épizootie 1965, identifié A22 par le Laboratoire mondial de référence provenant de Mahmatli, province d'Ankara, passée régulièrement et titrée sur bovin. Ce virus naturel a été utilisé pour éprouver les vaccins et pour culture tissulaire de virus. Dans le cas où le virus d'origine Frenkel a été employé comme virus d'ensemencement pour les cultures de tissu, ce virus naturel a d'abord été multiplié sept fois sur culture Frenkel.
2) Virus O, souche locale, venant de Hamadiye, province d'Ankara, de l'épizootie 1965, très proche de O1, selon le laboratoire de Pirbright. Ce virus a été aussi multiplié régulièrement et titré sur bovin. Il a été utilisé pour éprouver le vaccin et multiplié sur culture de cellules rénales de veau.

Culture de cellules

Les cellules ont été extraites du rein de veau par la trypsine, selon la méthode recommandée par Ubertini et la (9). Des plaques confluentes de cellules ont été produites en bouteilles de Povitsky de 5 litres pour la production de vaccin, en bouteilles Povitsky de 2 litres pour le passage du virus, en bouteilles de Blakes pour les courbes de croissance, en bouteilles de prescription de 4 onces pour le titrage du virus.

Le milieu nutritif des cellules était constitué d'une solution saline de Earle, contenant 0,5 pour cent d'hydrolysat de lactalbumine et 10 pour cent de sérum. Le milieu pour la multiplication du virus était le même, mais sans sérum. Des antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations suivantes: pénicilline 100 unités/ml, streptomycine 0,1 gr/litre et mucostatine 50 unités/ml.

L'adsorption du virus aphteux a été effectuée à 37°C pendant une heure. Nous avons utilisé 8 ml de virus par bouteille Povitsky de 5 litres, 4 ml par bouteille Povitsky de 2 litres, 2 ml par bouteille de Blakes 0,1 ml par bouteille de prescription de 4-oz. Toutes les cultures ont été lavées avant d'ajouter le virus. Après adsorption, le virus inadsorbé a été enlevé. Le milieu nutritif nécessaire au développement du virus a ensuite été ajouté, à raison de 250 ml pour les Povitsky de 5 litres, 100 ml pour les Povitsky de 2 litres, 50 ml pour les Blakes, 15 ml pour les bouteilles de prescription. Les cultures ont enfin été mises à l'étuve à 37°C pendant des durées différentes.

Paramètres

Nous avons étudié le titre d'infectiosité (IT), le titre antigénique (AT) et le titre antigénique de la suspension virulente traitée par l'arcton (ATAT).

1) Le IT a été déterminé en culture de tissu. Le virus a été dilué au 1/10. Nous avons utilisé trois bouteilles de prescription pour chaque dilution. Nous avons exprimé le IT par le coefficient logarithmique/I ml.

2) AT. Pour être très précis, le titre antigénique aurait dû être mesuré par la recherche de l'hémolyse 50, telle que la décrit Brooksby (32), ou par la méthode spectophotométrique de Osler, Strauss et Mayer (33), appliquée à la fièvre aphteuse par Roumabtsieff et al (34). Malheureusement, pour de nombreuses raisons d'ordre local, nous avons été obligés d'employer la méthode semi-quantitative selon Traub et Möhlmann(35) Camand (36). En conséquence, nos courbes de croissance de virus sont plus indicatives que quantitatives.

3) ATAT. La même remarque que ci-dessus doit s'appliquer à notre étude des titres antigéniques du virus traité par l'arcton. L'arcton 113 a été fourni par ICI Ltd, London. L'extraction par arcton a été effectuée par agitation à l'aide de l'omnimixer pendant 2 minutes, en utilisant 15 ml de suspension virulente et 10 ml d'arcton et ensuite par centrifugation 2000 tours par minute, pendant 5 minutes, et extraction de la phase aqueuse. Nous avons répété l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipité, généralement trois fois.

Vaccin

1) Préparation du vaccin

Nous avons utilisé la formule suivante:

- virus de culture de tissu	4,65 ml
- tampon au glucocolle pH-9	0,05 ml
- solution de formol à 5 pour cent (concentration finale 0,05 pour cent)	0,05 ml
- saponine à 10 pour cent dans tampon au glycocolle pH-7	0,25 ml
Dose vaccinale	5 ml

La saponine a été fournie par l'Institut français de la fièvre aphteuse, LYON. Cette saponine étant acide, nous l'avons neutralisée avec une solution tampon de glycocolle. L'inactivation au formol a été complétée par chauffage à 26°C pendant 48 heures.

2) Contrôle du vaccin

Pour vérifier l'efficacité de nos vaccins, nous avons utilisé le test classique de Schmidt et Fogedby (37). Le virus de bovin correspondant a été dilué, selon son titre d'infectiosité, pour obtenir 10.000 ID 50/0,1 ml et injecté par voie intradermo-linguale en deux points (0,1 ml chacun) aux bovins éprouvés, 21 jours après vaccination. La lecture a été effectuée les 3ème et 6ème-7ème jour.

La dose vaccinante 50 pour cent (DV 50) a été en premier étudiée par Henderson et Galloway (38) et largement employée par Mackowiak et ses collaborateurs (39,40,41,42,43) La dose protectrice 50 pour cent est la dose de vaccin nécessaire pour protéger la moitié d'un groupe de bovins. Seuls les animaux n'ayant pas de lésions secondaires podales ont été considérés comme protégés et tout animal ayant des lésions secondaires podales, même une seule, a été considérée comme non protégé. Le calcul a été effectué selon la méthode de Reed et Muench (44). Suivant Henderson et Galloway (38), les vaccins ont été éprouvés à une différence de volume approximativement voisin de 3. En fait, nous ne connaissions pas la réceptivité de nos bovins, mais nos résultats montrent qu'on aurait dû (pour toujours encadrer le DV50) utiliser, comme Mackowiak et coll. (41-42), la dilution de vaccin de voisin 4.

Comme nous avons considéré la dose de saponine de 25 mg, Girard et al (31), comme la quantité de saponine minimum mais nécessaire pour produire le meilleur effet adjuvant, nous avons toujours utilisé cette quantité pour compléter le vaccin dilué. Le diluant complémentaire a été le carbonate tampon, tel qu'il a été défini par Mackowiak et al (43).

Quatre groupes de 5 bovins chacun ont reçu sous un volume de 4,95 ml:

- groupe I	4,95 ml de vaccin
- groupe II	1,65 ml " "
- groupe III	0,55 ml " "
- groupe IV	0,183 ml " "

Les dilutions de vaccin ont été effectuées comme indiqué au Tableau I:

Tableau I Dilutions de vaccins antiaphteux

Désignation	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
Vaccin	4,95	1,65	0,550	0,183
Sol. de 10 pour cent sap.		0,1675	0,2225	0,24085
Carbonate tampon		3,1325	4,1775	4,52615
Dose vaccinale	4,95 ml	4,95 ml	4,95 ml	4,95 ml

Vingt et un jours après vaccination, les bovins vaccinés et les bovins témoins non vaccinés - nous avons utilisé dans notre épreuve 5 bovins témoins - ont été inoculés par voie intradermolinguale en deux points, avec 10 000 ID 50 du virus approprié, pour chacun d'eux.

RESULTATS

Expérience I

Les courbes de croissance du virus A ont été étudiées plusieurs fois, en fonction des trois paramètres: IT, AT, ATAT. Le diagramme 1 (culture FTA 18 TC 31) le diagramme 2 (culture FTA 22 TC 45) et le diagramme 3 (FTA 27 TC 65), indiquent leur évolution. D'une façon générale, IT atteint son sommet à la 18ème heure, AT est à son maximum vers la 24ème-30ème heure, ATAT atteint le palier vers la 30ème-36ème heure. Même après l'effet cytopathogénique et la lyse cellulaire, l'évolution du virus n'est pas terminée.

Expérience 2

Le but était d'étudier IT et AT après séries de passages du virus A, lorsque la culture de virus était recueillie i) après 24 heures; ii) après 48 heures; iii) 48 heures après qu'elle ait été ensemencée avec une culture de 24 heures. Les résultats apparaissent sur les diagrammes 4,5,6 et 7. Les passages en séries à partir de chaque culture à la 48ème heure, montrent de grandes variations d'une culture à l'autre, particulièrement en ce qui concerne AT. Les cultures en série de 24 heures sont plus régulières. Les AT de cultures en séries ensemencées avec des cultures de 24 heures, mais récoltées après 48 heures, sont plus élevés que ceux des cultures en série repiquées au bout de 24 heures.

Expérience 3

Partant de cultures récoltées à la 24ème heure, lorsque l'IT est encore élevé, nous passons le virus A en série et récoltons la culture de virus après 24, 30, 48 heures. Les AT et ATAT de chaque culture ont été étudiés; le diagramme 8 indique que les résultats des AT et ATAT sont toujours plus élevés après culture de 30 heures qu'après culture de 24 heures. En ce qui concerne les cultures de 30 heures et les cultures de 48 heures, les AT et ATAT sont égaux ou généralement en faveur des cultures de 48 heures. L'IT est également mentionné sur le diagramme 9. L'IT diminue toujours quand on va des cultures de 24 heures à celles de 48 heures.

Expérience 4

Du vaccin saponiné du type A a été préparé avec du virus de culture de tissu, passage 8, durée de la culture 30 heures, IT = $10^{-5.5}$, AT: 1/40=2, ATAT: 1/20=2, et injecté aux bovins à la dose de 5 ml.

Les résultats de l'épreuve effectuée 21 jours après la vaccination sont indiqués au Tableau II. Chez tous les animaux témoins on a assisté à une infection généralisée.

Tableau II - Epreuve sur bovins du vaccin type A préparé en culture de tissu

Bovins	Désignation	Lésions d'épreuve			
		Langue		Bouche	Pieds
		Locale-totale			
376-409	Vaccinés	0			
363-336		0			
414-355		0			
379-402		0			
374-387		0			
428-354		0			
308-378	Témoins	+	+	+	++++
343-401		+	+	+	++++
348-359		+	+	+	0++0
364-400		+	+	0	+0+0

Il n'a pas été noté de lésions, même au point d'injection du virus sur les bovins vaccinés.

Expérience 5

Les courbes de croissance du virus type O en culture de tissu sont transcrites sur les diagrammes 10, 11, 12 en termes de paramètres. IT atteint généralement son maximum vers la 16ème heure, mais parfois dès la 12ème heure. AT et ATAT sont tous deux à leur palier autour de la 24ème heure. Ensuite la souche O, Turquie 1965 (apparentée à O1) se multiplie apparemment plus vite et atteint sa maturité plus tôt que A 22 (Souche A, Moyen-Orient).

Expérience 6

Le développement rapide du virus O ne nous permet pas de montrer avec la même clarté qu'avec le virus A la différenciation, en termes de durée, de chaque paramètre. Néanmoins, il était intéressant d'étudier les paramètres de deux cultures de 24 heures, l'une ensemencée avec une culture de 16 heures, lorsque IT est à son maximum, l'autre passée en série de 24 en 24 heures. Les diagrammes 13 et 14 indiquent l'un AT et ATAT l'autre IT. En ce qui concerne IT, nous ne notons pas de différence significative. Il en est différemment pour AT et plus particulièrement pour ATAT. Dans les cultures de 16 à 24 heures, c'est-à-dire ensemencées avec un virus passé en série de 16 en 16 heures et récolté à la 24ème heure, les ATAT sont toujours plus élevés qu'avec un virus passé en série de 24 en 24 heures. Apparemment, le meilleur virus d'ensemencement est celui récolté au maximum de sa virulence.

Expérience 7

Deux doses de 5 ml de vaccins inactivés à la saponine ont été préparées avec du virus de culture de tissu, type O, pressage 11, mais l'un d'eux, nous l'appellerons 16/24, provient d'une culture ensemencée avec des cultures en série de 16 heures, l'autre - 24/24 - provient de passage en série de 24 en 24 heures. Les paramètres de ce virus sont indiqués au Tableau III.

Tableau III - Paramètres du virus utilisé dans la préparation du vaccin

Virus de culture de tissu	IT	AT	ATAT
16/24	$10^{-5,5}$	1/40=3	1/30=2
24/24	$10^{-5,4}$	1/30=3	1/20=2

Ces vaccins ont été éprouvés 21 jours après leur injection, avec du virus naturel O, passage 6 sur bovin, IT 10^{-8}/0,1 ml, avec 10 000 DI 50 x 2. Les résultats sont indiqués au Tableau IV. Les deux vaccins sont efficaces et du fait que leurs paramètres sont très proches, il n'y a apparemment pas de différence entre eux.

Tableau IV - Epreuve du vaccin O de culture de tissu sur bovins

Bovins	Désignation	Lésions d'épreuve						
		Langue		Bouche	Pieds			
		Locale	Totale		LFL	LHL	RHL	RFL
391-455	Vaccin 16/24	0	0	0	0	0	0	0
412-413	dose 5 ml	0	0	0	0	0	0	0
392-436	Vaccin 24/24	0	0	0	0	0	0	0
433-443	dose 5 ml	0	0	0	0	0	0	0
466	Témoins	+	+	+	+	+	+	+
461		+	+	+	+	+	+	+

Ainsi, nous avons essayé de différencier la valeur respective de chaque vaccin - vaccin 16/24 et vaccin 24/24 par l'étude de la DV 50. Les vaccins ont été injectés aux groupe I (dose normale), groupe II (1/3 de dose), groupe III (1/9 dose), groupe IV (1/27 dose).

Pour l'épreuve, nous avons rafraîchi notre virus O bovin, passage V, par deux passages successifs sur bovin et nous avons titré à nouveau le passage VII. Le titre de virulence a été de $10^{-7,7}$/0,1 ml.

Les résultats enregistrés aux 3ème et 6ème jours suivant l'inoculation d'épreuve, sont indiqués au Tableau V.

Le calcul de la dose vaccinale 50 pour cent du vaccin 24/24 peut être établi comme suit:

Dose ml	Log.dose	Résultats observés		Résultats accumulés		% protection
		+	-	+	-	
4,95	0,694	5	0	17	0	100
1,65	0,217	5	0	12	0	100
0,55	$\bar{1}$,740	4	1	7	1	87
0,183	$\bar{1}$,262	3	2	3	3	50

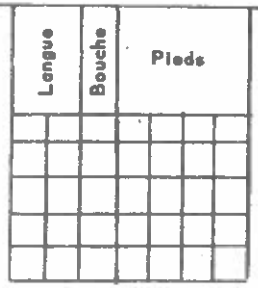
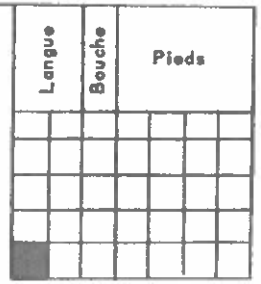
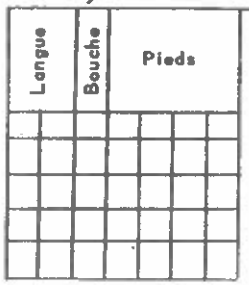
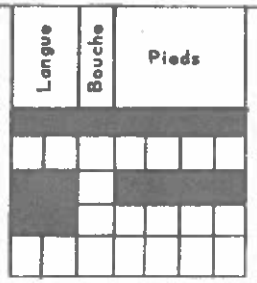
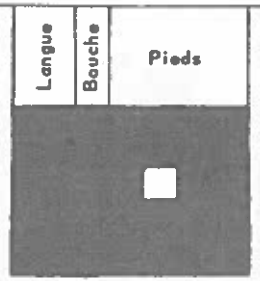
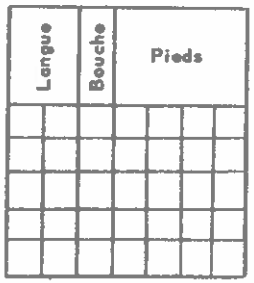
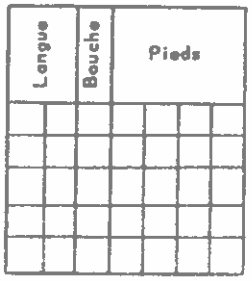
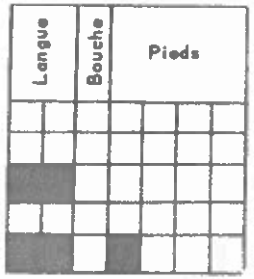
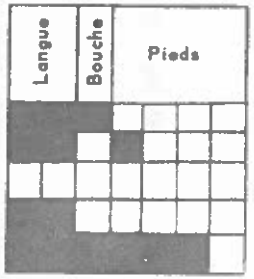
dans ce cas la DV 50 est immédiatement connue: DV 50=0,183 ml, mais de façon plus générale:

$$\log DV\ 50 = \bar{1},740-(0,478 \times \frac{87-50}{87-50}) = \bar{1},262$$

C'est pourquoi la dose vaccinale 50 pour cent = 0,183 ml

La DV 50 du vaccin 16/24 ne peut pas être calculée du fait qu'elle est en dehors du diagramme, néanmoins, elle n'est sûrement pas très éloignée de la DV 50 du vaccin 24/24. Ceci doit seulement montrer qu'à une meilleure ATAT correspond un vaccin de meilleur pouvoir immunigène.

Tableau V - Résultats de la dose vaccinale bovine 50%

Lot	1 dose	$\frac{1}{3}$ dose	$\frac{1}{9}$ dose	$\frac{1}{27}$ dose	Témoins
16/24					
24/24					

Langue
Bouche
Pieds

DISCUSSION

Dans la production d'un vaccin antiaphteux concentré à partir de culture de tissu, deux facteurs peuvent intervenir. En premier lieu, l'addition de saponine, en second lieu la qualité immunigène du virus.

En ce qui concerne la saponine, Strobbe et al (45) réduisent la dose bovine de leur vaccin de 20 ml à 10 ml à la suite de l'action de la saponine, bien que dans leur travail, du fait qu'ils ont mélangé virus naturel Frenkel et virus de culture de tissu, il soit difficile d'établir l'action à imputer au virus de culture de tissu. Mais Schneider et al (46) ont produit un véritable vaccin de culture de tissu concentré la dose bovine étant de 5 ml, en employant 2 ml de suspension virulente. Dans notre cas, du fait que nous n'utilisons plus d'hydroxyde d'alumine, la concentration est encore plus facile.

En ce qui concerne le virus, depuis 1952 Fogedby et Johnson travaillant avec du virus A ont montré la valeur de l'augmentation de la durée de culture du virus Frenkel, pour produire un meilleur vaccin; mais, par la suite, Henderson (48) travaillant avec du virus A et O a montré que ce phénomène était lié à la souche de virus. En 1959, Sellers (13) montre avec un vaccin préparé à partir de virus multiplié en cultures de tissu rénal de porc et injecté à des cobayes 1) que "des vaccins fabriqués avec du virus récolté à partir de 42 heures et au-delà semblaient donner une meilleure protection que des vaccins préparés avec du virus récolté au bout de 18 heures". 2) que "des vaccins préparés à partir de récoltes de 18 et 42 heures de cultures ayant reçu l'inoculum le plus important, ont conféré une protection meilleure que des vaccins préparés à partir de récoltes de 66 et 90 heures, et que des vaccins préparés à partir de récoltes de 42 et 66 heures de cultures ayant reçu le plus petit inoculum, ont donné une protection meilleure que des vaccins préparés à partir de récoltes de 18 et 90 heures." Ces faits, apparemment en opposition, deviennent clairs si nous les exprimons en termes de paramètres. L'IT dont Henderson et Galloway (49) ont déclaré qu'il était le paramètre de référence pour produire un vaccin efficace et qui a été utilisé par Frenkel lui-même au début de sa production de vaccin, n'a pas pu être retenu comme tel par Girard et Mackowiak (51-52), Moosbrugger (53), Ubertini et al (54), Willems et Leunen (55). A cet égard, Frenkel et Robelin (56) ont par la suite affirmé "nos données appuient la conclusion que l'IT du virus ne peut pas être utilisé avec précision pour évaluer le taux d'anticorps se maintenant en présence de titres d'infectivité décroissants. Le titre d'infectivité ne mesure pas l'antigène viral total". Graves (16) a conclu: "L'emploi de l'infectivité du virus pour apprécier l'efficacité du vaccin est inadéquat du fait que les propriétés immunisantes stables se sont maintenues en présence de titres d'infectivité en diminution. Du virus avec le plus haut IT n'a pas nécessairement produit la meilleure réponse immunologique". Cependant, l'IT reste un paramètre important en ce qui concerne le virus d'ensemencement. En vérité, nos données actuelles vont à l'appui de la conclusion que, avec une quantité égale de virus d'ensemencement, le virus ayant l'IT le plus élevé donne les meilleurs paramètres lorsqu'il est multiplié. Si Girard et Mackowiak (51) ont considéré que AT était seulement un paramètre nécessaire pour être sûr que le virus récolté était de bonne qualité mais non pour impliquer obligatoirement sa valeur antigénique, Ubertini et al (54) Willems (55) ont insisté, non sans raison (AT et ATAT se développent souvent dans une direction parallèle) sur l'importance de l'obtention d'un AT élevé pour produire un bon vaccin. Mais Girard et al (31) ont montré que, en ce qui concernait le virus Asia 1, avec un IT élevé, on n'obtenait pas toujours du vaccin efficace. Depuis, Brown et Newman (30) ont montré que l'ATAT est la véritable "mesure in vitro de la puissance" d'un vaccin FMD, Girard et al (31) confirment ce fait en ce qui concerne le vaccin Asia 1. Nos données actuelles viennent à l'appui de la même conclusion.

RESUME ET CONCLUSIONS

Le virus de culture de tissu peut produire un bon "immunigène" aussi bien que le virus naturel ou de culture Frenkel. Cependant, pour tous les ovins, nous devons prendre en considération la signification de leurs paramètres. Le titre d'infectivité aussi bien que le titre antigénique n'impliquent pas nécessairement la valeur du vaccin correspondant. Concernant la production des vaccins de culture de tissu, le virus d'ensemencement doit être prélevé au maximum d'infectivité, alors que, pour obtenir du virus de valeur immunigène maximum il doit être prélevé lorsque le virus traité à l'arcton atteint son titre de fixation du complément maximum.

Avec un virus de haut titre d'antigène traité à l'arcton, l'obtention d'un vaccin concentré n'est plus un problème.

REMERCIEMENTS

Les auteurs désirent exprimer leurs remerciements à MM. M. Oral et au Dr C. Boz qui ont effectué les épreuves sérologiques.

Références

1. Sellers R.F.
Growth and titration of the viruses of FMD and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue cultures
Nature, 1955, 176, 547-549

2. Bachrach HL, Hess W.R., Callis J.J.
FMDV: Its growth and cytopathogenicity in tissue culture
Science 1955, 122, 1269-1270

3. Petermann G.H. Lang R., Mackowiak C.
Propagation du virus de la fièvre aptheuse en culture de tissu
Comp.R. Acad. Sc,. 1956, 243, 991-993

4. Wesslen T., Dinter Z.
The cultivation and titration of FMD virus in cultures of different bovine tissues
Nordisk. Vet. Med. 1956, 8, 795-806

5. Mazzaracchio V., Orfei Z., d'Amore A., Ravaioli L., Castagnoli B.,
Il virus aftoso su coltura in vitro
Zooprofilassi 1956, 5, 277-282

6. Ubertini B., Nardelli L,, Santero G. Panina G.
Large scale production of FMD
J. of Bioch and Microbio Technol. and Enginer. 1960, 2, 327-338

7. Bachrach H.L., Callis J.J., Hess W.R., Patty R.E., de Boer C.J. Hamblet F.E.,
Large scale production of bovine kidney cultures for assay of FMDV and its Ribonucleic Acid
Amer. J. of Vet., Res., 1962, 23, 608-613

8. Leunen J,, Strobbe R., Mammerlickx M.,
Notice technique sur un appareil à rouler les flacons pour cultures de cellules rénales
Bull. off. Mt. Epiz., 1962, 57, 615

9. Ubertini B., Nardelli L., Del Prato., Panina G., Santero G.,
Large scale cultivation of FMDV on calf kidney cell monolayers in Rolling bottles
Zent. f. Vet. Med., 1963, 2, 93-101

10. Leunen J., Mammerickx M, Strobbe R.,
La préparation industrielle des cultures cellulaires à l'Institut national de recherches vétérinaires de Bruxelles par la technique des flacons roulants
Bull. off. Int. Epis. 1963, 59, 1019-1036

11. Polatnick J. Bachrach H.L.
Production and purification of Milligram amounts of FMDV from baby hamster kidney cell cultures.
Microb. 1964, 12, 368-373

12. Fontanelli E. Orfei Z. Testi B.
La méthode des cultures cellulaires monostratifiées. Aide très importante pour les laboratoires de recherches dans les épizooties à virus
Bull. Off. Int. Epis., 1960, 54, 310-367

13. Sellers R.F.
The growth and antigenicity of the virus of FMD in pig kidney tissue cultures
Arch. Virusfoisch. 1959, IX, 621-636

14. Patty R. E., Norcross N.L.
Production of FMD virus with high complement fixing antigenicity
Amer. Journ. Vet. Research 1961, 22, 775-778

15. Sellers R. F., Burt L.M., Cumming A., Stewart D.L.,
The behaviour of strains of the virus of FMD in pig, calf, ox, and lamb kidney tissue cultures.
Arch. Virusforsch. 1959, IX, 637-646

16. Graves J.H.
Foot-and-mouth disease vaccine. The production of antigen in cultured cells in absence of serum
Am. J. Vet. Res., 1963, 24, 183-186

17. Mazzaracchio V., Zavagli V., Orfei Z., d'Amore A., Ravaioli L., Castagnoli B.,
Controlla sperimentale della efficiencia nei bovini di un vaccino antiaftosa con virus coltivati su cellule renali tripsinizzati di suini
Zooprofilassi. 1957, 12, 539

18. Mazzaracchio V., Zavagli V., Orfei Z., d'Amore A., Ravaioli L., Castagnoli B.,
Nouveau vaccin antiaphteux préparé avec des virus de culture sur reins de porc
Bull. Off. Int. Epiz., 1958, 49,91

19. Dinter Z., Wesslen R.,
Etude sur la production et le contrôle du vaccin antiaphteux préparés selon la technique des cultures de tissus
Bull. Off. Int. Epiz., 1958, 49, 87

20. Armbruster O., Back W. Garbe H.C. Pilz W., Schweckendick O.E.,
Herstellung und Wirksamkeitsnachweiss mono und trivalenter MKS-Vakzinen aus virus von Nerenzellkulturen
Monatsch. f. Tierheilk., 1959,11, 254-258

21. Armbruster O., Back W., Garbe H.C., Pilz W., Schweckendick O.E.,
versuche zur Bestimmung der Immunitäts dauer von 4 verschiedenen trivalenten MKS-Kulturvirus- und Naturvirus-Vakzinen am Rind.
Monatsch. f. Tierlieilk., 1960, 12, 223-229

22. Ubertini B., Nardelli L., Panina G., Santero G. (Brescia) and Michelsen E., Borgen H.C. (Lindholm)
Vaccination des bovidés avec virus aptheux cultivé sur cellules renales
Bull. Off. Int. Epiz., 1961, 55, 1433

23. Leunen J. Strobbe R., Mammerichx M.,
Contribution a l'étude d'un vaccin antiaphteux préparé à partir de virus produits en cultures de cellules rénales
Bull. Off. Int. Epiz., 1962, 57, 601-614

24. Cardassis J. Pappous C. Brovas D., Stouraitis P., Seimenis A.
Test of infectivity and dosage of foot-and-mouth disease vaccine in sheep.
Rep. of the meeting of the Res. Groupe of the standing technical committee, Lyons 25 Sept.-1 Oct., 1965

25. Ubertini B., Nardelli L., Dal Prato A., Panina G., Santero G.,
Préparation et efficacité des vaccins antiaphteux concentrés, produits à partir du virus cultivé sur cellules rénales de veau
Bull. Off. Int. Epiz., 1962, 57, 634-650

26. Randrup A.
On the stability of bovine foot-and-mouth disease virus dependant on pH. Investigations on the complement fixing and the immunigenic antigen as well as on the infective agent.
Acta. Path. Microbiol. Scand., 1954, 35, 388

27. Brown F. and Crick J.
Application of agar gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease
J. Immunol., 1959, 82, 444

28. Mussgay M.
Trennung Zweier spezifischer Einheiten des virus der Maul-und Klauenseuche mit einem Fluor Kohlen Wasserstoff
Z. Hyg. Infektkr., 1959, 146, 48

29. Brown F. and Cartwright B.
Purification of the virus of foot-and-mouth disease by fluorocarbon treatment and its dissociation from neutralizing antibodies
J. Immunol., 1960, 85, 309

30. Brown F. and Newman J.F.E.
In vitro measurement of the potency of inactivated foot-and-mouth disease virus vaccines
J. Hyg. Camb. 1963, 61, 345

31. Girard H.C. Charutamra U, Sinitinondana P., Supaviali P.,
A propos du vaccin formole saponine contre la fièvre aphteuse de type Asia 1,
Bull. Off. Int. Epiz., 1964, 61, 1026-1057

32. Brooksby J. B.
The technique of complement fixation in FMD Research
Agr. Res. Coun. Rep., Ser. No. 12, 1952

33. Osler A. G. Strauss J.H., Mayer M. M.
Diagnostic complement fixation. 1) a method
Am. J. Syph. Gonor. Ven. Disease, 1952, 36, 140-153

34. Roumiantseff M. Stallmann C. Dubouclard C.,
Technique de fixation quantitative du complément appliquée à l'étude du virus de la fièvre aphteuse
Bull. Soc. Sc. Vet. Lyon 1965, 3, 1-23

35. Trub E., Möhlmann H.,
Type bestimmung bei Maul und Klauenseuche mit Hilfe der Complement bindungsprobe
Zentralbl. Bakt. 1-orig., 1943, 150, 259-300

36. Camand R.
Etude sérologique des types et variants du virus aphteux par la réaction de fixation du complément
These doc. Vet., Lyon 1953, Bose edit.,

37. Schmidt S., Fogedby E. F.
Méthodes de production et de contrôle du vaccin antiaphteux telles qu'elles sont appliquées au Danemark
Bull. Off. Int. Epiz., 1949, 31, 65

38. Henderson W. M. Galloway I.,
The use of culture virus in the preparation of FMD vaccine
J. Hyg. Camb., 1953, 51, 546-558

39. Mackowiack. Lang R., Petermann H.G., Roumiantzeff M. Fontaine J., Stellmann C.,
Contrôle quantitatif du vaccin anthiaphteux 1) titrage des anticorps neutralisants chez les cobayes vaccinés
Rev. Med. Vet. 1965, 116, 497

40. Roumiantzeff M., Fontaine J., Stellmann C., Mackowiak C.,
Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux II) Détermination de la dose vaccinante 50 pour cent chez le cobaye
Rev. Med. Vet., 1965, 116

41. Terre J., Bornarel P., Stellmann C., Soulebot J.P.,
Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux IV) détermination de la dose vaccinante 50 pour cent chez le bovin
Rev. Med. Vet., 1965, 141

42. Mackowiak C., Fontaine J., Terre J., Stellmann C., Roumiantzeff M., Petermann H.G.,
Quantitative control of foot-and-mouth disease vaccine. Study of the dose-effect law and correlation between the 50 per cent vaccinating dose in guinea pig and in cattle.
Rep. of the Res. Group of the standing tech, Committee. Lyons, 28 Sept. 1 Oct. 1965

43. Terre J. Dubouclard C., Bornarel P., Roumiantzeff M., Fontaine J., Mackowiak C.,
Preliminary note on the quantitative control of FMD trivalent vaccine in cattle by the simultaneous inoculation of the three types of virus.
FAO tech. committee. Lyons 28 Sept. 1 Oct. 1965

44. Reed L. T., Muench H.,
A simple method of estimating fifty per cent endpoints.
Amer. j. Hyg., 1938, 27, 493

45. Strobbe R., Leunen J., Mammerickx M., Debecq S.,
Valeur à longue échéance du vaccin antiaphteux adsorbé, saponine trivalent
Bull. Off. Int. Epiz., 1964, 61, 1059-1078

46. Schneider B., Jaeger O., Berigelsdorff H.J.,
Durée de l'immunité et taux des anticorps déterminés chez les bovins par l'utilisation de vaccins antiaphteux adsorbés préparés avec du virus obtenu en culture tissulaire.
Bull. Off. Int. Epiz., 1964, 61, 1013-1023

47. Fogedby E. F., Johnson M.L.
Expériences faites avec la méthode de Frenkel
Bull. Off. Int. Epiz., 1952, 37, 473

48. Henderson W. M.
The use of virus in FMD research
Proc. 15th Int. Vet. Congr. Stockholm 1953, 2, 206

49. Henderson W. M., Galloway I. A.
The use of culture virus in the preparation of FMD vaccine
J. Hyg. Camb., 1953, 51, 546

50. Frenkel H.S.,
La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'apithélium de la langue des bovidés
Bull. Off. Int. Epiz., 1947, 28, 155

51. Girard H.C., Mackowiak M.,
La culture du virus aphteux au stade industriel
Rev. Immunol., 1953, 17, 224

52. Girard H.C., Mackowiak M.,
Au sujet de la concentration en virus du vaccin antiaphteux.
Bull. Off. Int. Epiz., 1956, 45, 497

53. Moosbrugger G.A.,
La concentration du virus dans le vaccin antiaphteux et ses méthodes d'extraction
Bull. Off. Int. Epiz., 1955, 43, 606

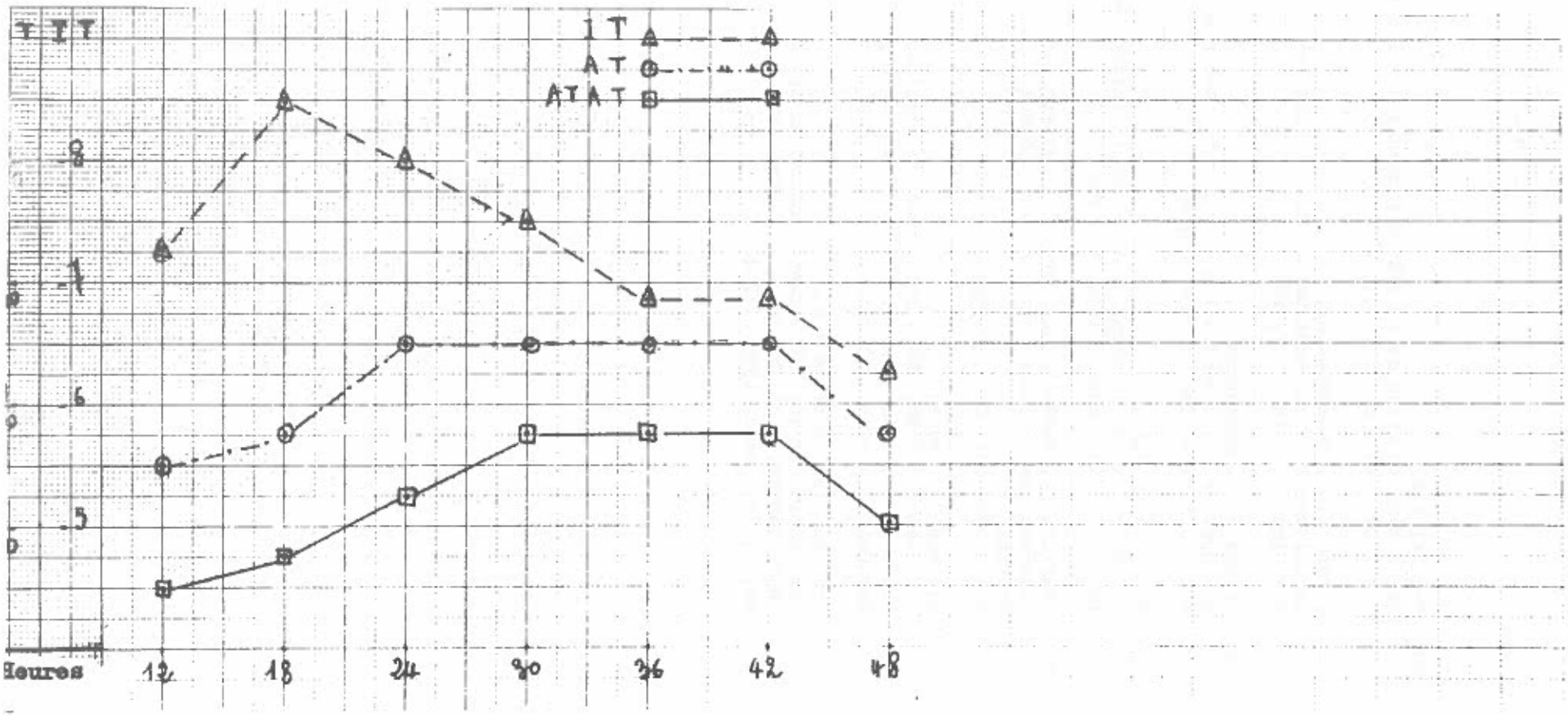
54. Ubertini B., Nardelli L., Barei S., Santero G.,
Observations et études sur le virus aphteux cultivé in vitro selon la méthode Frenkel
Bull. Off. Int. Epiz., 1955, 43, 559

55. Willems R., Leunen J.,
Application of the FMD virus., Results obtained at the state veterinary laboratory, Uccle-Brussels the European Productivity Agency of the Organization for European Economic Cooperation Paris, 1957

56. Frenkel H.S., Ribelin W.E.,
Cultivation of the FMD virus in explanted epithelium of the bovine tongue. Growth characteristics of the virus in large scale tissue cultures.
Am. J. Vet. Res., 1956, 17, 40

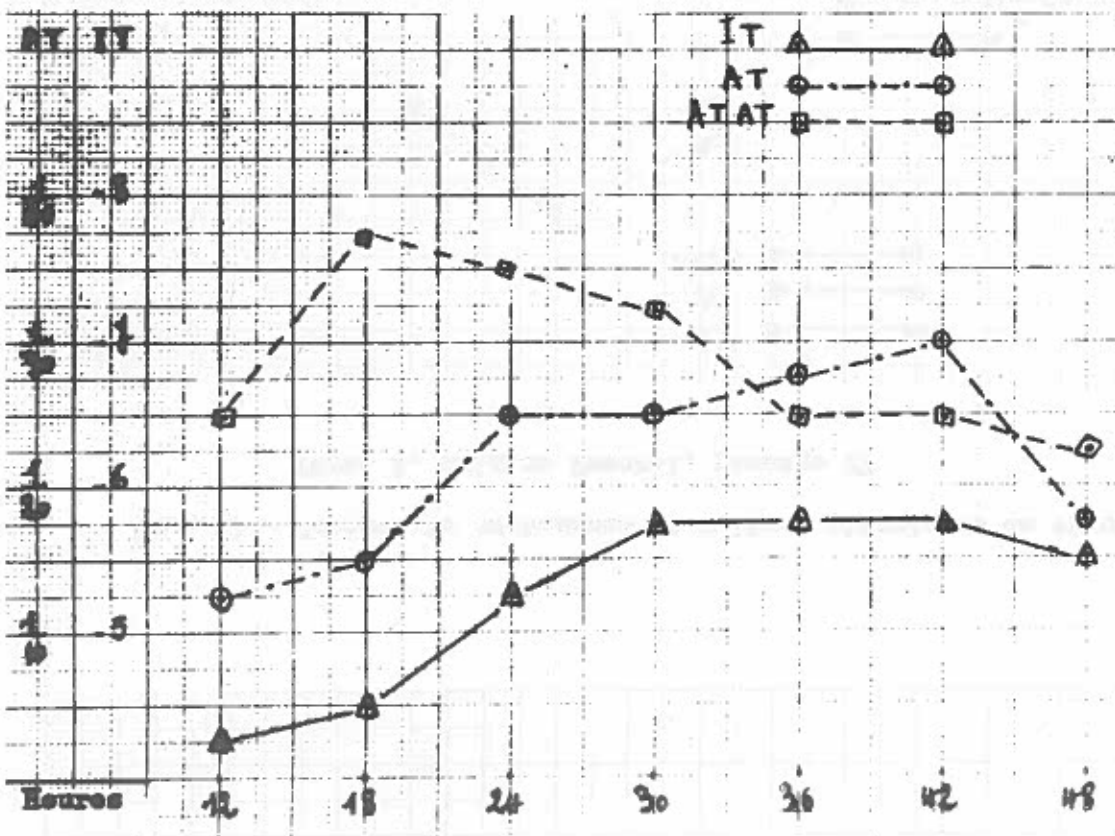
Diag. 1 - Courbes de croissance de culture tissulaire de virus FTA 18 TC 31

Virus A, origine Frenkel, passage 18



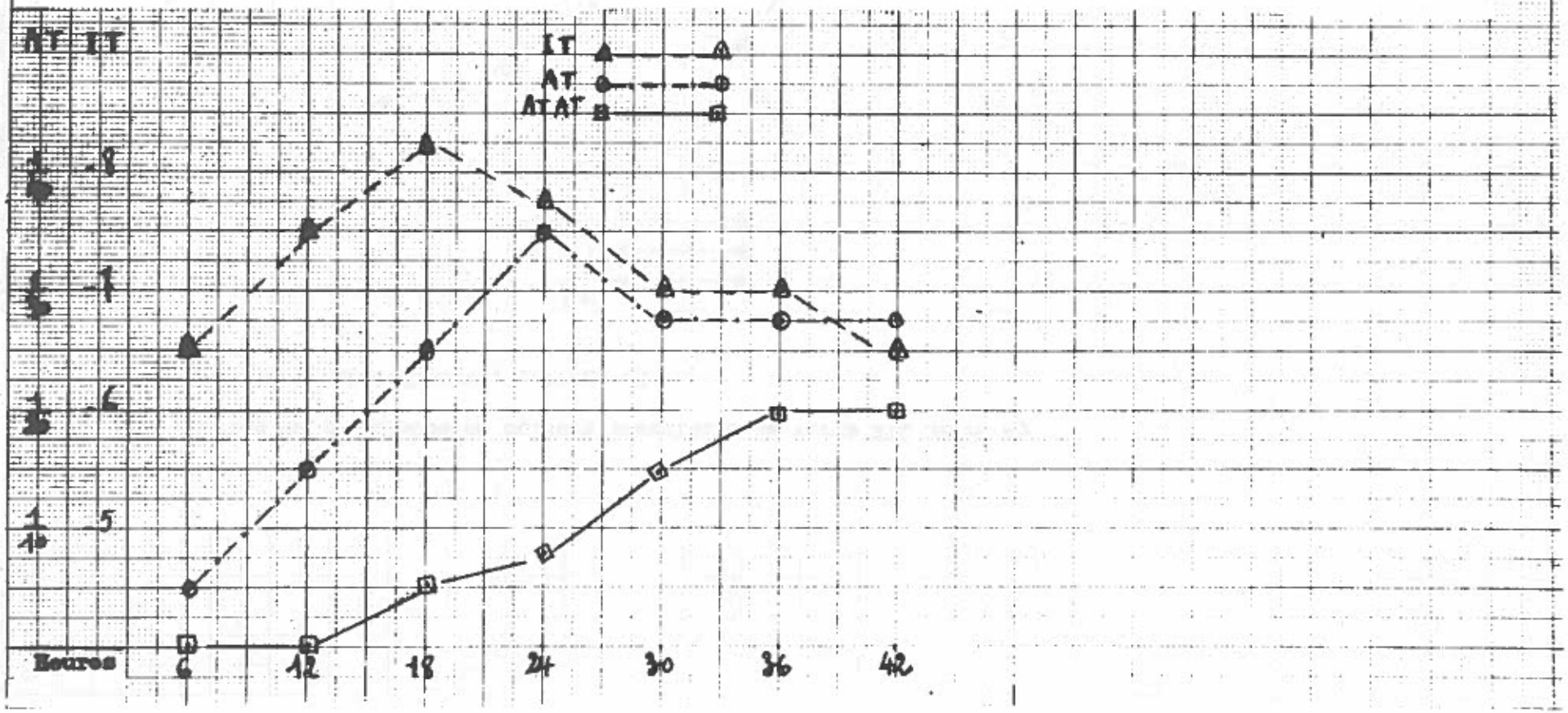
Diag. 2 - Courbes de croissance de culture tissulaire de virus FTA 22 TC 45

Virus A, origine Frenkel, passage 22



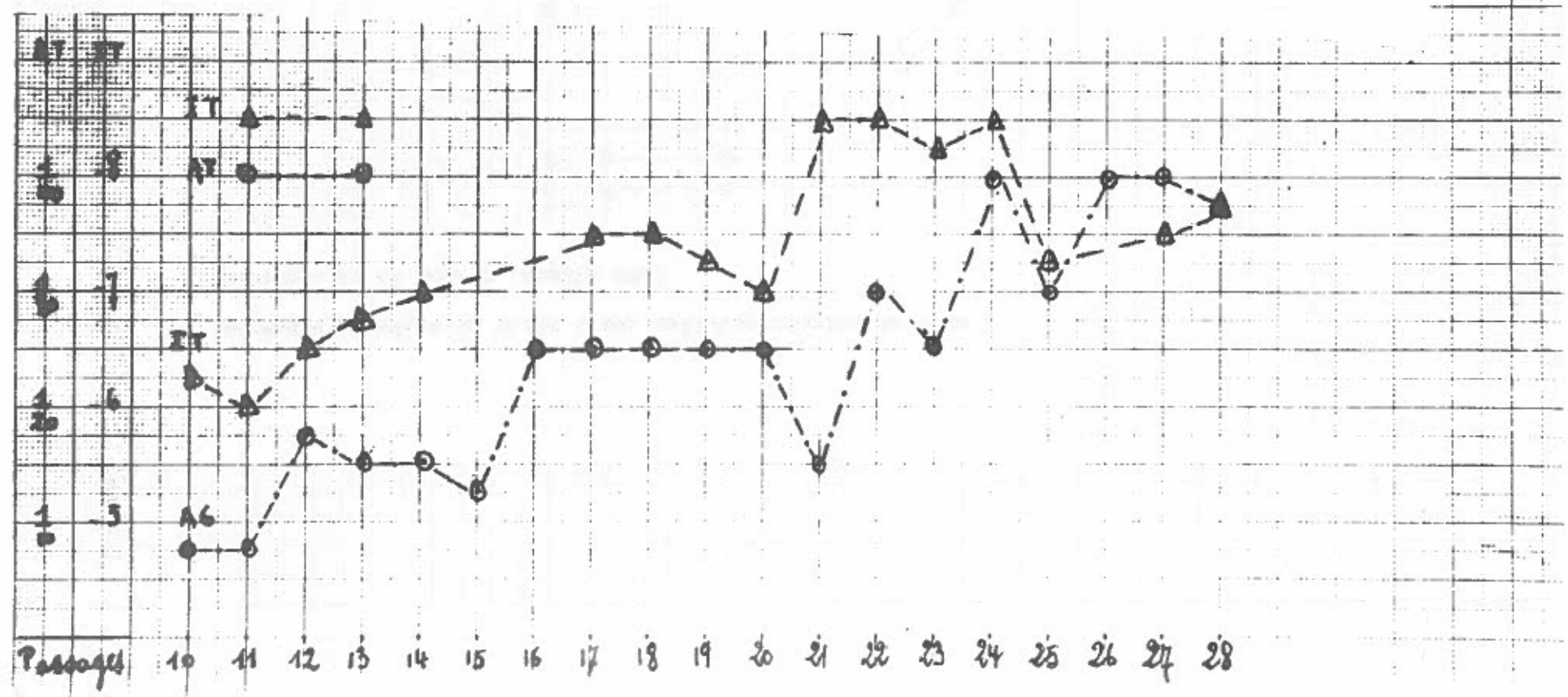
Diag. 3 - Courbes de croissance de culture tissulaire de virus FTA 27 TC 65

Virus A, origine Frenkel, passage 27



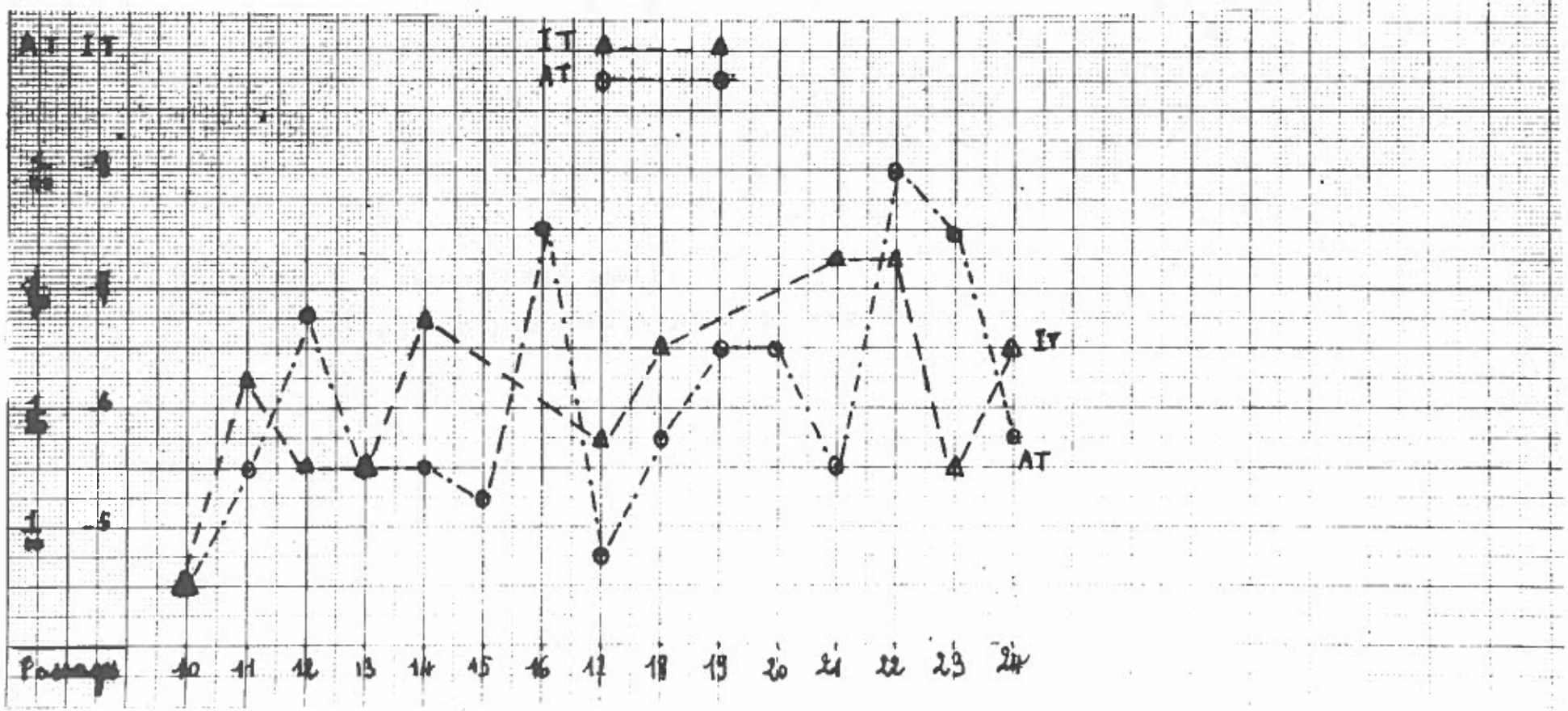
Diag. 4 - Passages en série du virus A sur cellules rénales de veau.

Cultures de 24 heures (courbe PTA)



Diag. 5 - Passages en série du virus A sur cellules rénales de veau

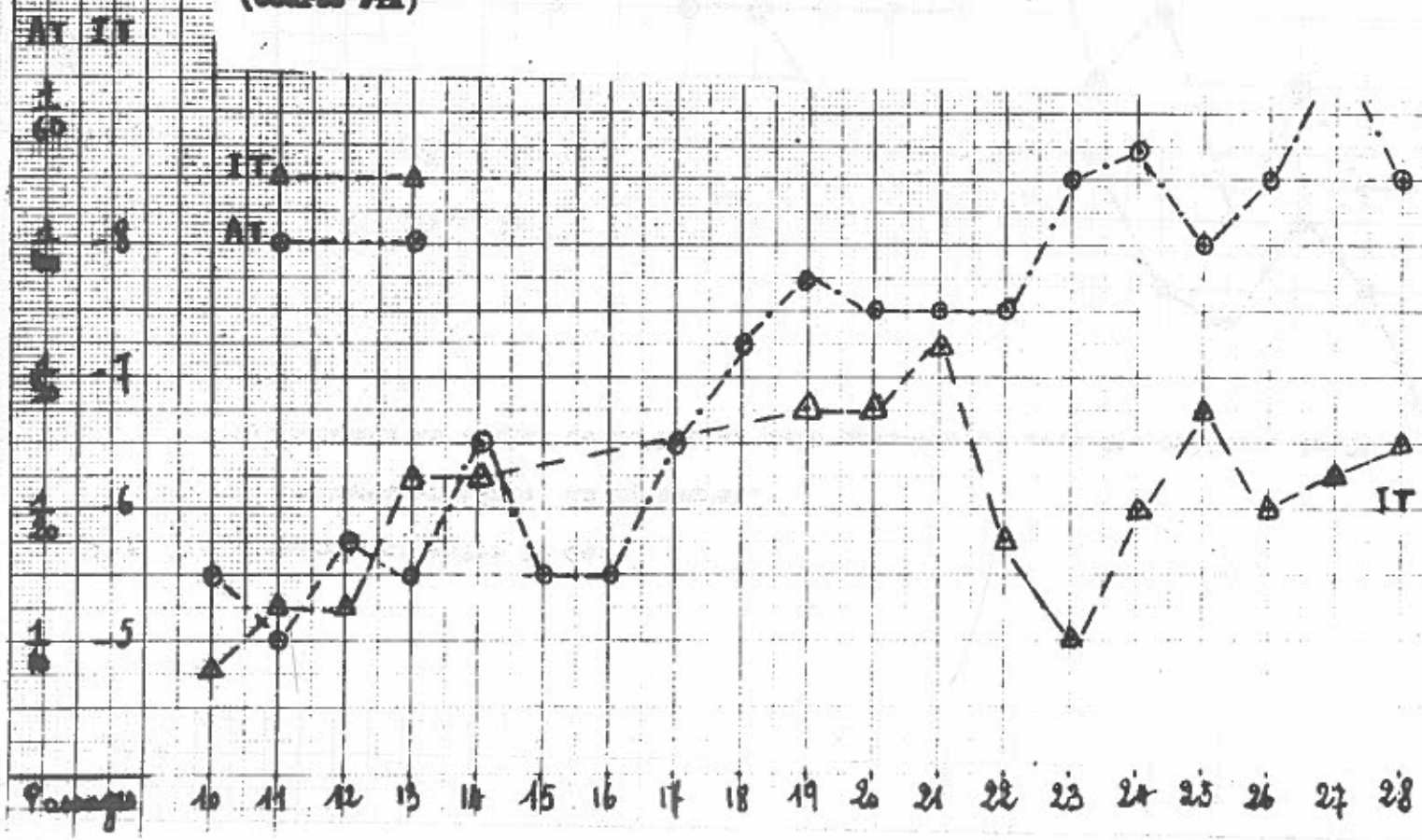
Cultures de 48 heures (courbe FTA)



Diag. 6 - Passages en série du virus A sur cellules rénales de veau.

Cultures de 48 heures, mais ensemencées avec des cultures de virus de 24 heures.

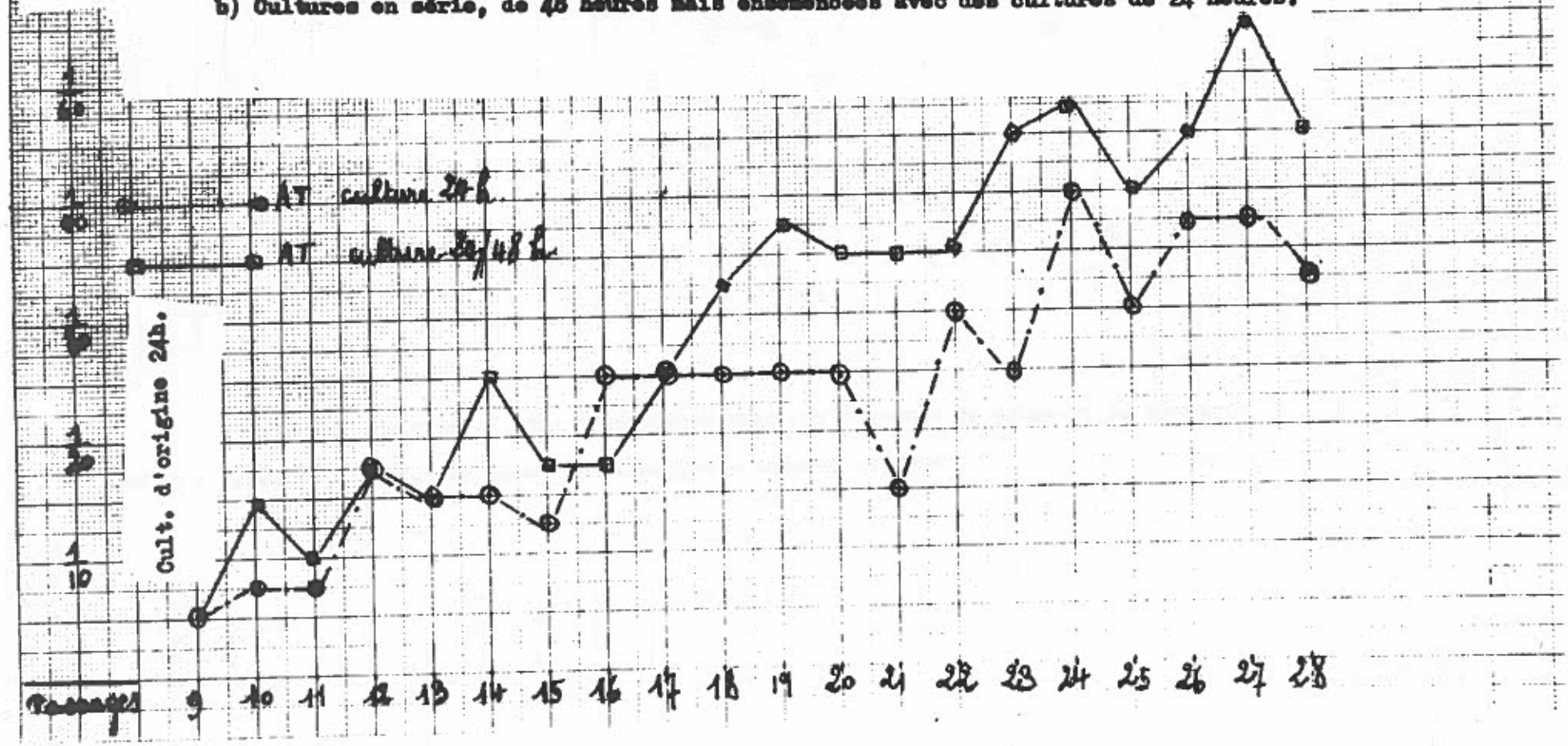
(courbe FFA)



Diag. 7 - Comparaisons entre AT de:

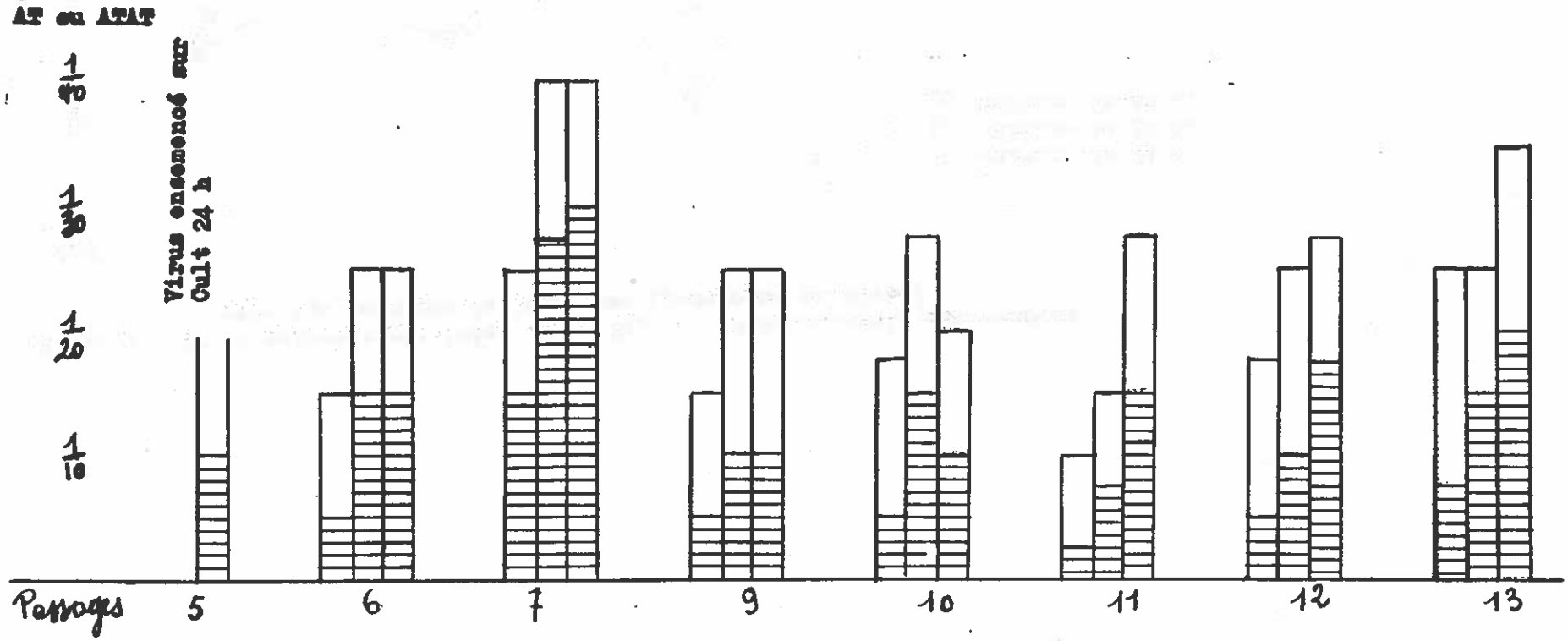
a) Cultures en série, de 24 heures.

b) Cultures en série, de 48 heures mais ensemencées avec des cultures de 24 heures.

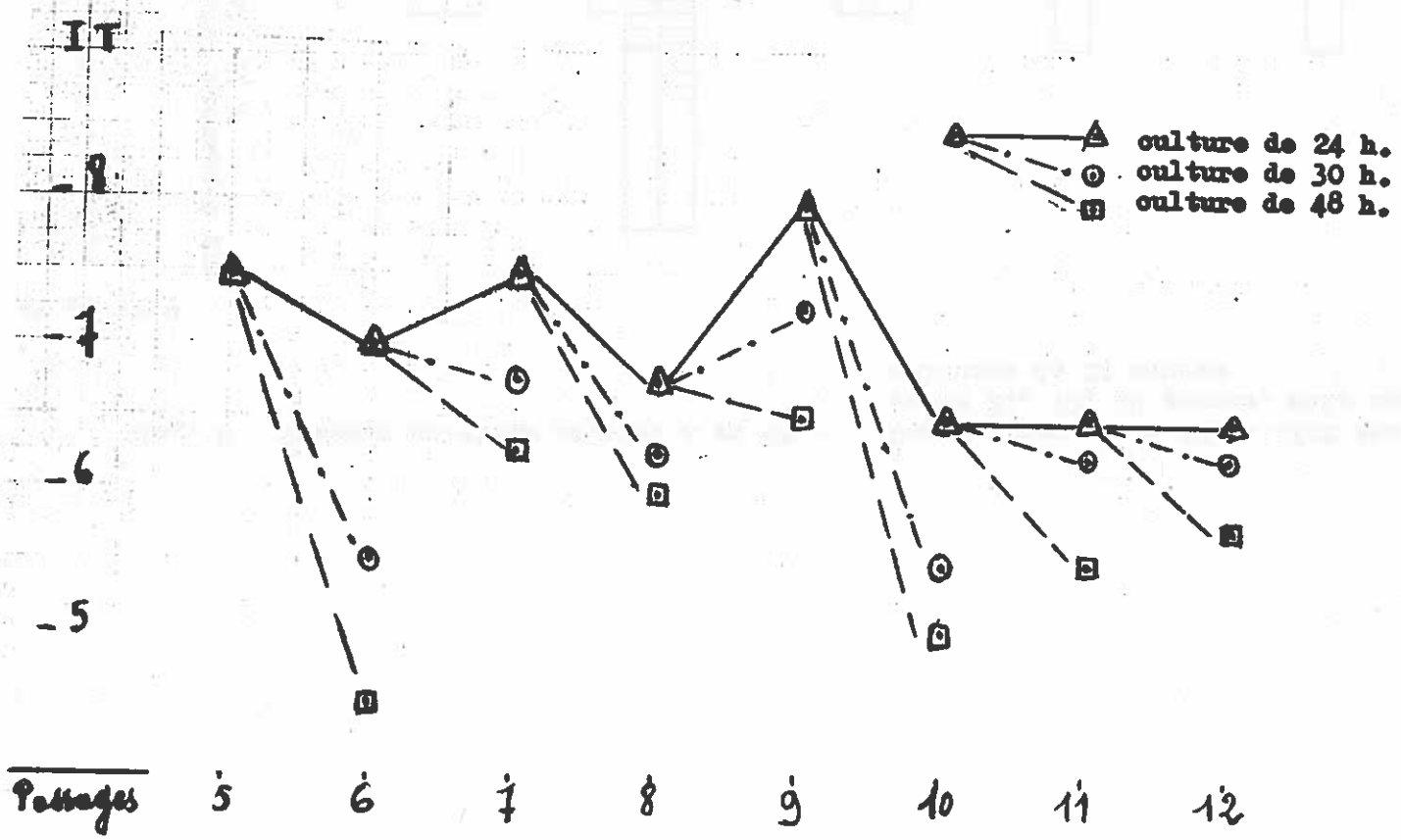


Diag. 8 Passage du virus naturel A en CT

Comparaison entre AT et ATAT des cultures récoltées après 24, 30, 48 heures, mais ensemencées avec des cultures de 24 heures

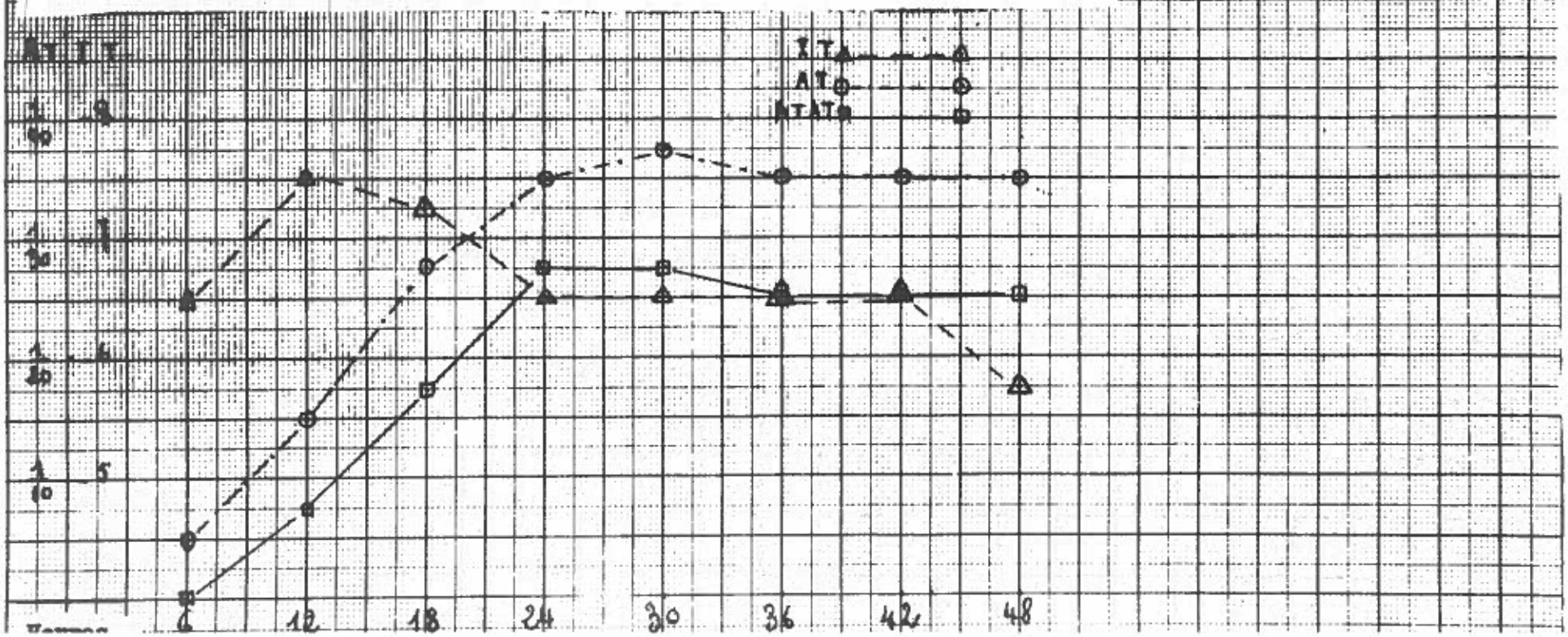


Diag. 9 IT de cultures récoltées après 24, 30, 48 heures mais ensemencées avec des cultures de 24 heures (passages en série)



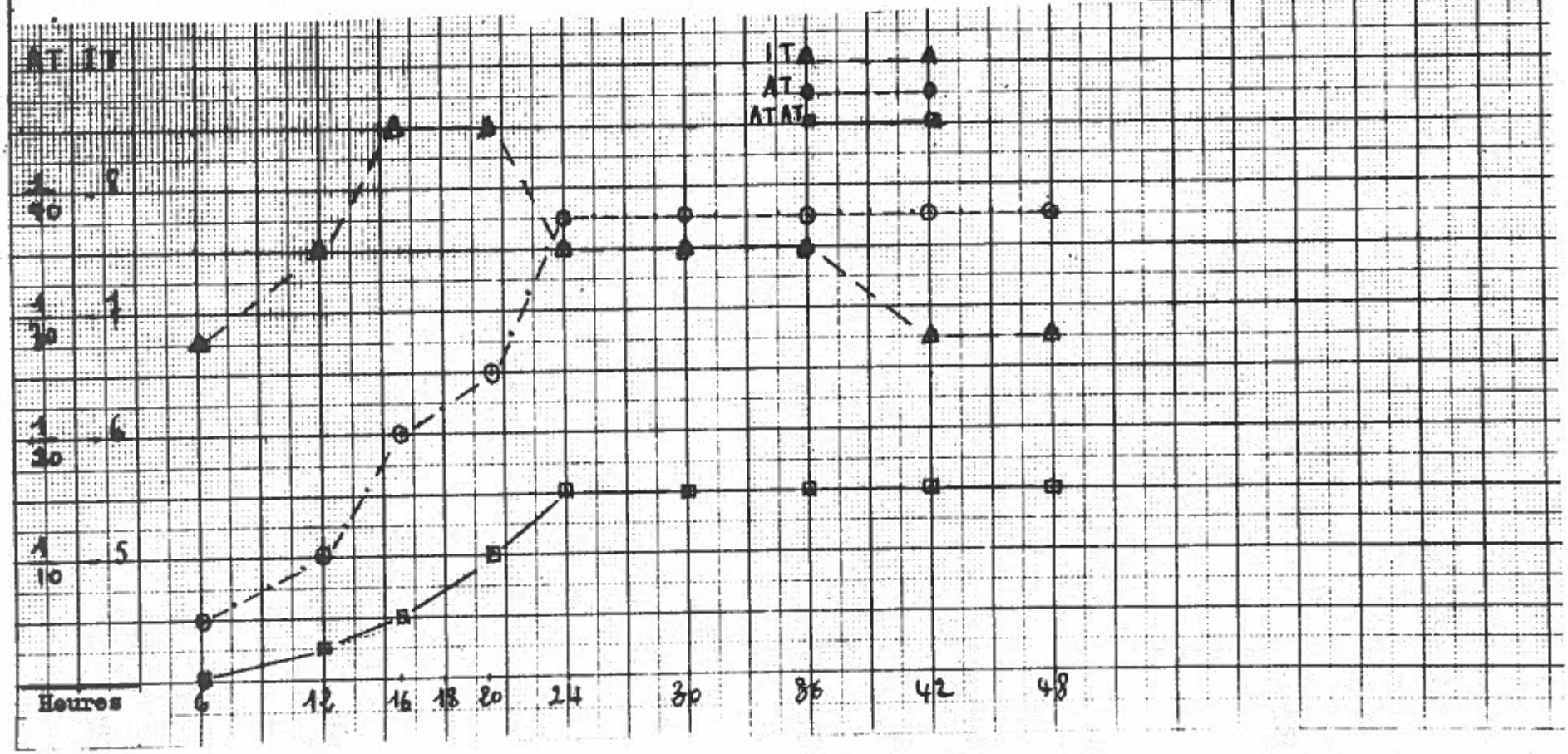
Diag. 10 - Courbes de croissance de culture tissulaire de virus HOP 8 TC 4

Virus O, origine bovine, passage 8



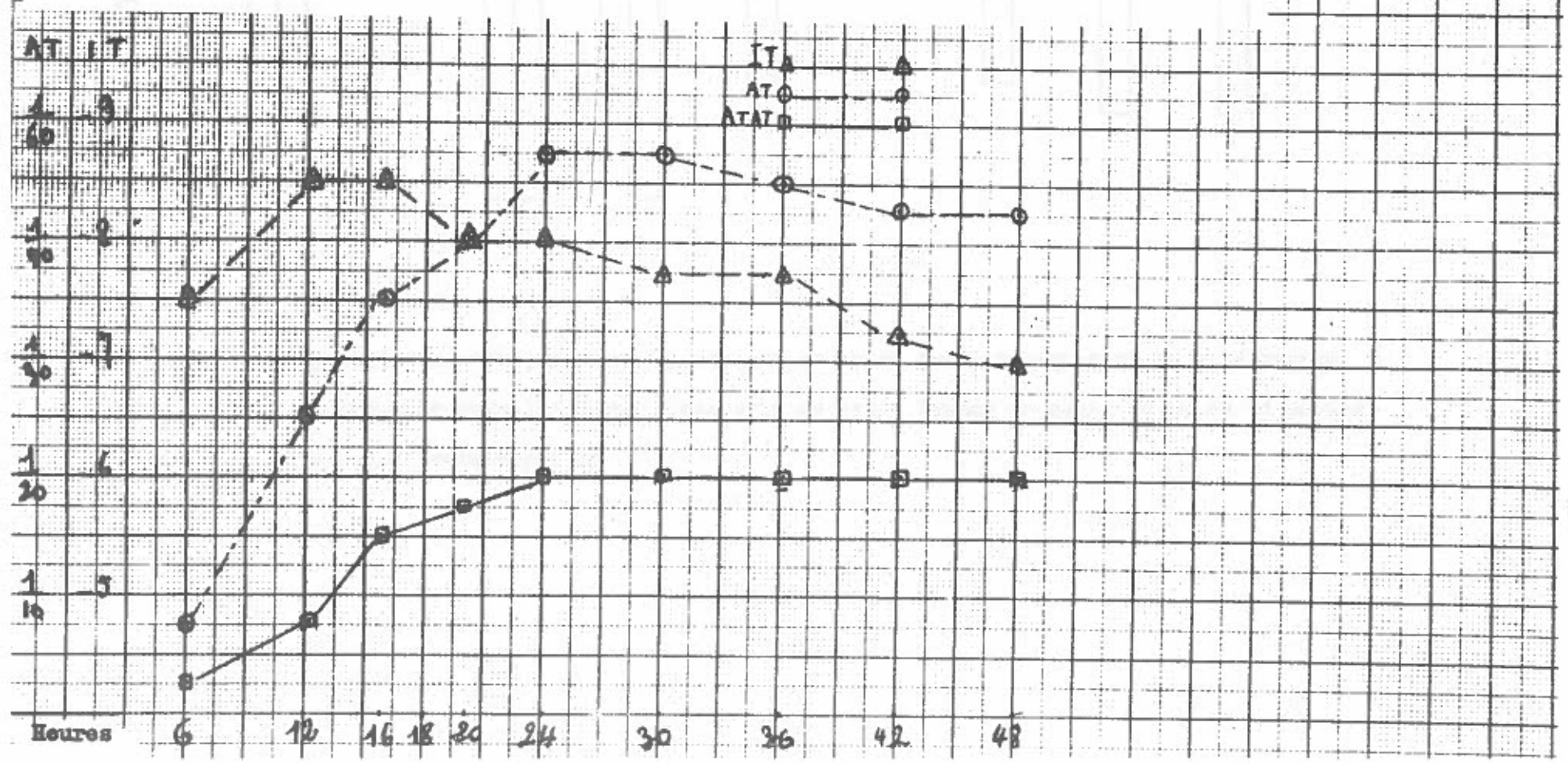
Diag. 11 – Courbes de croissance de culture tissulaire de virus HOP 10 TC 7

Virus O, origine bovine, passage 10



Diag. 12 - Courbes de croissance de culture tissulaire de virus HOP 13 TC 10

Virus O, origine bovine passage 13

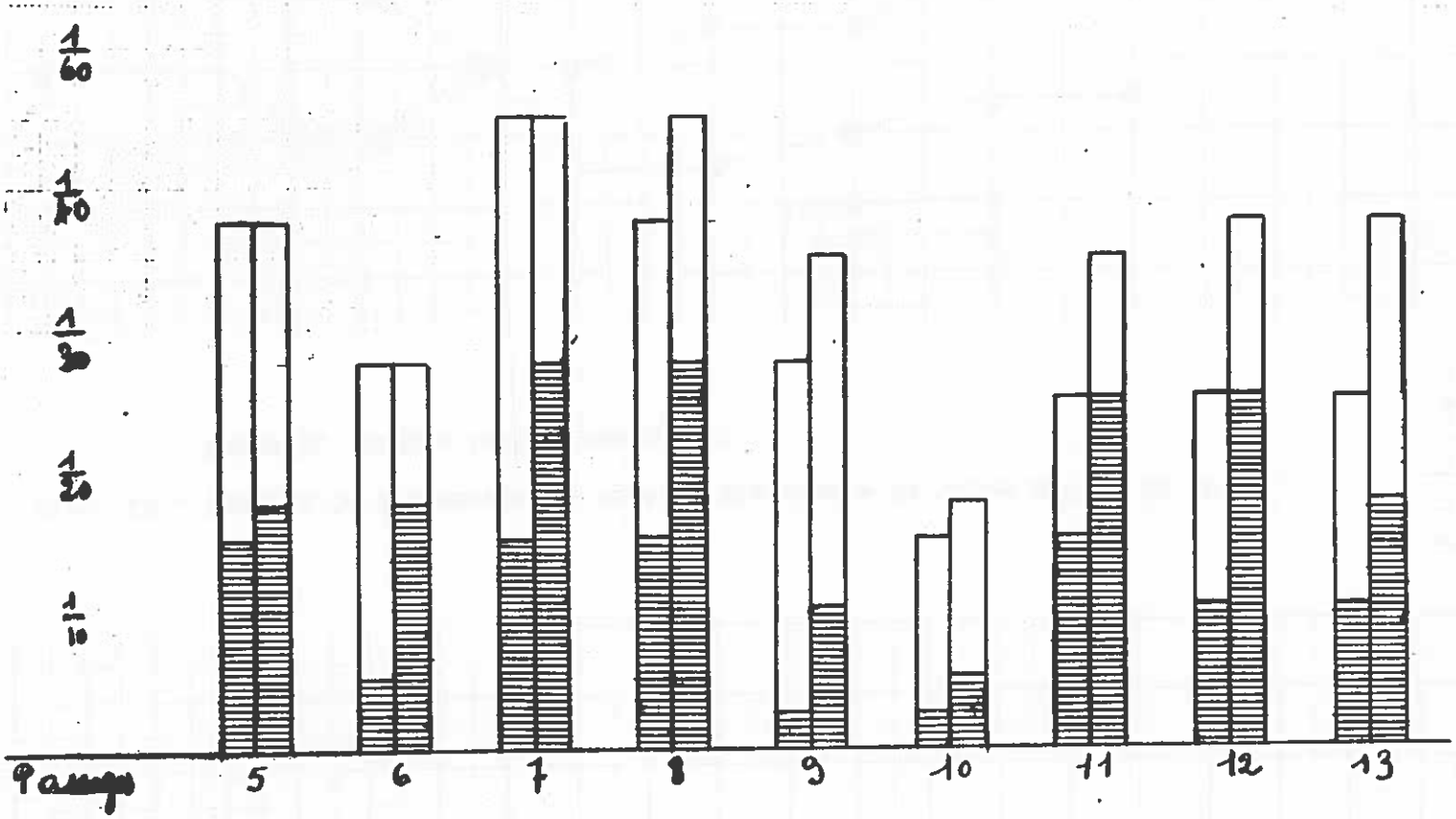


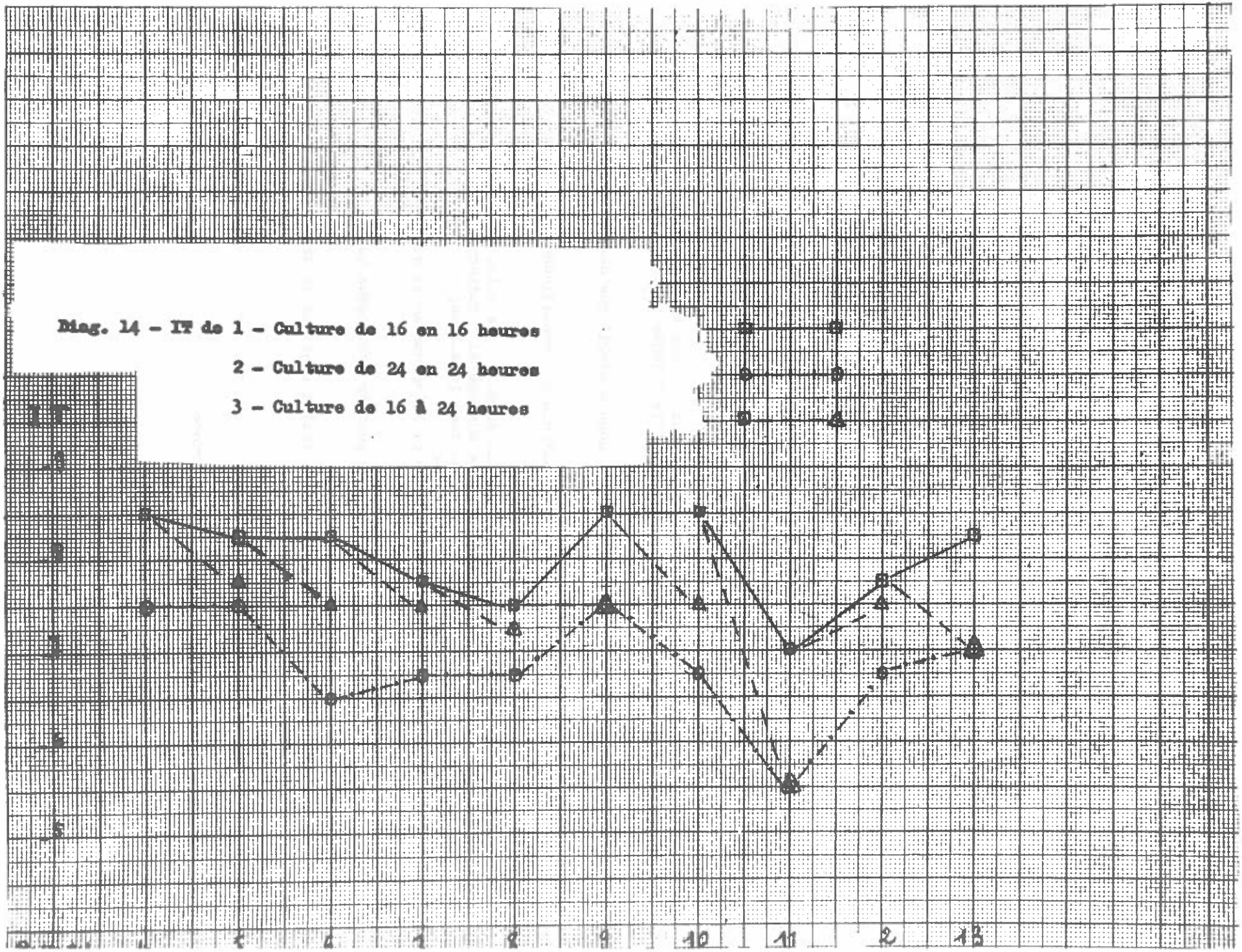
Diag. 13 - AT et ATAT comparatifs de

AT ou ATAT

1-(Première colonne) Culture tissulaire de virus passée en série de 24 en 24 heures

2-(Deuxième colonne) Culture tissulaire de virus passé en série de 16 à 24 heures





Diag. 14 - IT de 1 - Culture de 16 en 16 heures

2 - Culture de 24 en 24 heures

3 - Culture de 16 à 24 heures

ANNEXE 6

CULTURE DU VIRUS APHTEUX EN SUSPENSION CELLULAIRE STATIONNAIRE ET ETUDE DE SON POUVOIR IMMUNOGENE

par

F. Lucam, G. Dannacher, M. Fedida*

La culture du virus aphteux, en suspension cellulaire, a fait l'objet, dans ces toutes dernières années, d'un certain nombre de travaux.

Patty (R.E.) et coll. (9) la réalisent sur cellules trypsinées de rein de veau, maintenues en suspension, par agitation, dans une solution de Hanks additionnée de sérum de veau. De Boer (C.J.) et coll. (3), Mazzaracchio (V) et coll. (8), Babini (A) (2), Gramenzi (F) et Rossi (G.A.) (4) l'effectuent, à leur tour, et confirment les résultats des premiers auteurs.

Par la suite, Patty (R.E.) et coll. (10), poursuivant leurs essais, obtiennent une abondante production de virus, tout en simplifiant la technique initiale par suppression, en particulier, de l'injection d'un mélange gazeux dans le milieu de culture et de l'agitation de la suspension cellulaire qui devient alors "stationnaire". Dans ces conditions, Tozzini et Zavagli (12) arrivent à produire le virus à l'échelle industrielle.

A première vue, il semble donc qu'il y ait là une méthode très simple de production abondante de virus aphteux qui pourrait être retenue en vue de la préparation des vaccins.

Cependant, avant d'en arriver là, il nous a semblé que deux séries de points méritaient d'être précisées.

Les premiers ont trait à certains facteurs qui conditionnent directement la production du virus, à savoir :

1. la nature de la composition saline du milieu de culture;
2. la concentration cellulaire de la suspension "stationnaire";
3. la présence ou l'absence de sérum dans le milieu;
4. la hauteur du sédiment cellulaire;
5. le rapport entre le volume d'air et le volume de la suspension;
6. la quantité de virus ensemencé.

Les seconds ont trait à la mesure du pouvoir immunogène du virus obtenu par cette méthode de culture.

L'étude de ces deux séries de points fait l'objet de ce travail.

---

* Laboratoire de virologie animale, Lyon, France.

MATERIEL ET METHODES

I. Cellules

La culture est faite sur cellules rénales de veau. Pour les préparer, la corticale d'un rein de veau de 6 à 8 semaines est finement découpée aux ciseaux. Après une prétrypsination de 20 à 30 minutes à 37°C, les fragments sont soumis à une série de digestions en trypsine, de 5 à 10 minutes, suivant la méthode de Youngner (13). On utilise la trypsine à 0,25 pour cent dans la solution de Hanks ou de Earle. Les cellules obtenues sont lavées dans les mêmes solutions, puis recueillies par centrifugation.

II. Cultures cellulaires en couche unistratifiée

Elles sont nécessaires pour effectuer les titrages de virulence au cours des expériences, ainsi que pour produire le virus qui sera ensemencé en suspension stationnaire.

On utilise comme milieu de croissance le milieu à l'hydrolysat de caséine de Lépine et coll. (6), mélangé, à parties égales, avec la solution de Hanks et additionné à 5 pour cent de sérum de veau ainsi que d'antibiotiques. (Pénicilline 200 µg/ml, Streptomycine 100 µg/ml, Auréomycine 20 µg/ml). Les cellules, provenant de la trypsination, sont mises en suspension dans ce milieu à la concentration de 1/300, ce qui correspond à environ 400 000 cellules au ml, comme permet de le vérifier la méthode de numération de Sanford et coll. (11). On répartit la suspension en tubes de 16 mm à raison de 1,5 ml par tube. Au bout de 4 à 6 jours à l'étuve à 37°C, on obtient un tapis cellulaire unistratifié qui peut être ensemencé avec le virus à cultiver.

III. Cultures en suspension cellulaire stationnaire

Tout comme dans le cas des cultures cellulaires en couche unistratifiée, les cellules rénales de veau sont d'abord obtenues par trypsination puis mises en suspension, à concentration connue, dans une solution saline additionnée d'antibiotiques.

Après répartition en flacons et ensemencement en virus, les suspensions sont placées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. A aucun moment, elles ne sont l'objet d'une agitation ou d'un barbotage par injection d'un mélange gazeux.

La récolte du virus est faite par congélation et décongélation rapides des suspensions, suivies d'une centrifugation à 3 000 tours par minute pendant 10 minutes. Le liquide surnageant est titré sur cultures cellulaires en couche unistratifiée.

IV. Virus utilisés

Il s'agit des virus aphteux des types O (souche O Flandre 1947) et A (souche Eystrup 1952), préalablement cultivés sur cellules rénales de veau en couche unistratifiée. Leurs titres infectieux sont exprimés dans tous les cas en DICT/ml, c'est-à-dire en nombre, au millilitre, de doses infectieuses à 50% pour culture cellulaire.

V. Les vaccins

Ils sont préparés avec le virus O, obtenu en suspension cellulaire stationnaire; ils servent à apprécier le pouvoir immunogène de ce virus.

Le virus est adsorbé sur hydroxyde d'alumine et inactivé par le formol à 0,05 pour cent à la température de 25°C pendant 48 heures.

Leur composition est la suivante :

Hydroxyde d'alumine à pH 8	100 ml
Tampon glycocolle	20 ml
Soude normale	2 ml
Suspension virulente	120 ml
Formol au 1/20	2,4 ml

Le pH final est d'environ 8,2.
La dose vaccinale est de 10 ml.

Chaque vaccin est caractérisé par :

1. le nombre de $DICT_{50}$ de virus entrant initialement dans la dose vaccinale;
2. son Indice de protection K.

RESULTATS

Facteurs conditionnant la production du virus

I. Influence de la composition saline du milieu de culture

Une comparaison est faite entre les solutions de Earle et de Hanks, telles qu'elles ont été établies à l'origine et dont la différence de composition porte principalement sur la teneur en CO^3NaH qui est de 2,2 par 1000 pour celle de Earle et 0,35 par 1000 pour celle de Hanks. Pour cela, 4 cultures sont conduites dans les conditions suivantes :

Boîte de Roux de 1 000 ml
Volume de la suspension cellulaire : 100 ml
Solution saline : Earle ou Hanks selon les cas
Concentration de la suspension cellulaire : 1/100
Virus : O Flandre
Titre de virulence initial des cultures : $10^{3,8}$ et 10^8
Titrage de virulence final : établi après 24 heures de culture.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le Tableau I.

TABLEAU I

No des cultures	Solutions salines	Log. du titre initial	Log. du titre final
1	Earle pH 7,6	3,8	6,5
2	Earle pH 7,6	4,8	6,8
3	Hanks pH 7,2	3,8	5,3
4	Hanks pH 7,2	4,8	7,2

Le tableau I montre, en premier lieu, que les deux solutions salines sont à elles seules parfaitement aptes à assurer la croissance du virus.

Il montre, en second lieu, qu'avec une concentration initiale de virus de $10^{3,8}$ $DICT_{50}$/ml, les titres obtenus avec la solution de Earle, sont plus élevés qu'avec la solution de Hanks; mais qu'avec une quantité de virus ensemencé plus forte ($10^{4,8}$ $DICT_{50}$/ml), la différence disparaît. Ce phénomène peut être expliqué de la

façon suivante. Les cellules en survie provoquent l'acidification du milieu, laquelle contrarie la croissance du virus. Il s'ensuit que la production de ce dernier sera d'autant plus grande que la solution saline freinera mieux, par ses tampons, cette acidification. On peut donc supposer que la solution de Earle s'est montrée, de ce point de vue, plus efficace que celle de Hanks, lorsque la concentration du virus ensemencé a été de $10^{3,8}$ $DICT_{50}$/ml.

Mais, d'autre part, plus la quantité de virus ensemencé est grande, plus le nombre de cellules infectées initialement est élevé. Il s'ensuit que la production du virus est plus rapide et peut s'effectuer avant que d'être entravée par l'acidification du milieu. Et c'est pourquoi, lorsque la quantité de virus ensemencé a été de $10^{4,8}$, cette production a été sensiblement la même avec chacune des solutions salines, la différence du pouvoir tampon entre ces dernières n'ayant pas eu le temps de se manifester.

En conclusion, la solution de Earle, permettant d'obtenir une quantité de virus toujours égale ou supérieure à celle que fournit la solution de Hanks, a été retenue par les expériences ultérieures.

II. Influence de la concentration cellulaire de la suspension

Dans une première expérience, un certain nombre de cultures sont réalisées dans les conditions suivantes :

Boîtes de Roux de 1 000 ml
Volume de la suspension cellulaire : 100 ml
Solution saline : Earle (pH 7,6)
Concentration de la suspension cellulaire : variable
Virus : O Flandre
Titre de virulence initial des cultures : $10^{3,8}$
Titrage de virulence final : établi après 24 heures de culture.

Les résultats de cette première expérience sont représentés par la figure 1, où sont portés en abscisse, à la fois la concentration cellulaire des suspensions et le log du nombre correspondant de cellules par ml et, en ordonnée, le log du titre de virulence final.

La courbe de la figure 1 montre que les quantités de virus obtenues augmentent régulièrement quand la concentration cellulaire augment, elle même, du 1/500 au 1/100; qu'elles sont sensiblement égales et maximales, pour les concentrations du 1/100 et du 1/50; qu'elles diminuent rapidement lorsque la concentration atteint le 1/33 et le 1/20.

Dans une seconde expérience, destinée à compléter la première, une comparaison est faite, entre les courbes de croissance de trois cultures réalisées dans les conditions suivantes :

Boîtes de Roux de 1 000 ml
Volume de la suspension cellulaire : 100 ml
Solution saline : Earle (pH 7,6)
Concentration de la suspension cellulaire : variable
Titre initial de virulence des cultures : $10^{3,8}$
Titrage de virulence des cultures : établi toutes les 2 heures jusqu'à 40 heures.

Les résultats de cette seconde expérience sont représentés par la figure 2 où sont portés, en abscisse, les temps en heures et, en ordonnée, les log des titres infectieux correspondants.

Les courbes de la figure 2 montrent que la concentration cellulaire à 1/100 permet d'obtenir la plus grande quantité de virus (titre de la culture : $10^{6,8}$), dans le délai le plus court (20 heures).

Figure I

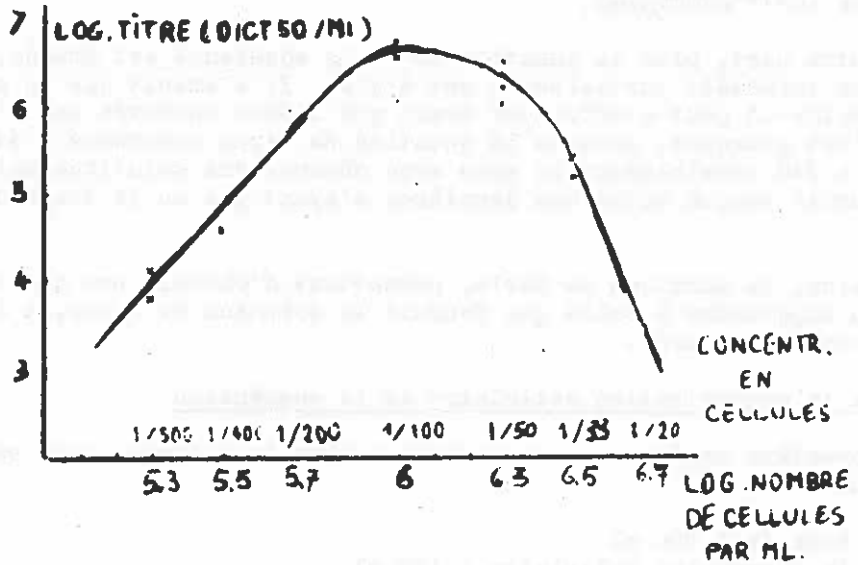
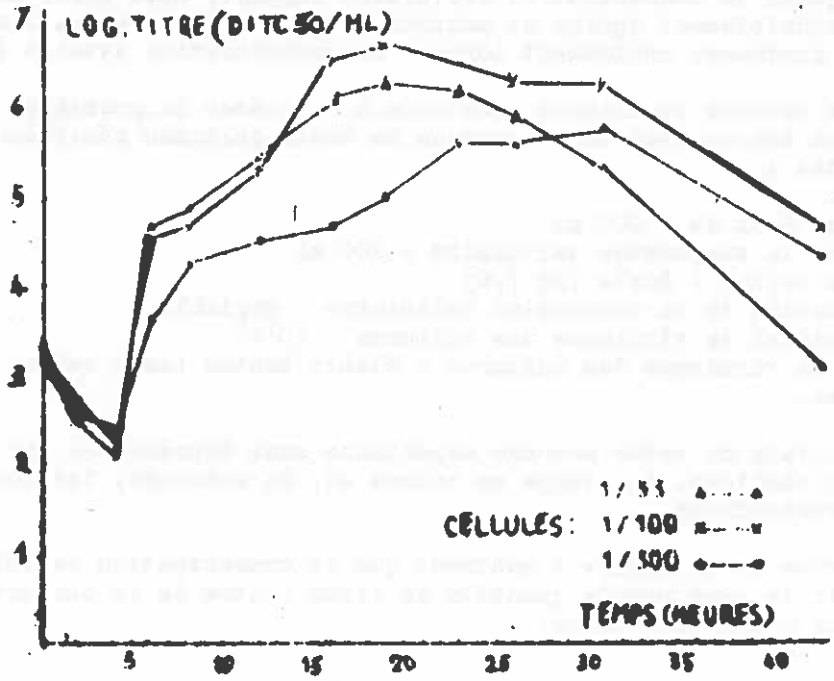


Figure II



De ces deux expériences on peut conclure que la concentration cellulaire à retenir, comme la plus favorable, est celle du 1/100.

III. Influence de la concentration en sérum du milieu

Au cours des expériences précédentes, les milieux de culture ne contenaient pas de sérum. Il s'agit donc de savoir si l'addition de sérum de veau, habituellement utilisé pour les cultures cellulaires en couche unistratifiée, est un facteur favorisant pour la production du virus en suspension cellulaire stationnaire.

Plusieurs séries de cultures sont réalisées dans les conditions suivantes :

Boîtes de Roux de 1 000 ml
Volume de la suspension cellulaire : 100 ml
Solution saline : Earle (pH 7,6)
Concentration de la suspension cellulaire : 1/100
Mélange de sérums de veau : 0% to 15%
Virus : O Flandre
Titre initial de virulence des cultures : $10^{3,8}$
Titrage final : effectué à la 24e heure.

Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le tableau II.

TABLEAU II

Concentration en sérum	0 %	2 %	4 %	5 %	6 %	8 %	10 %	15 %
Log. Titre final de virulence								
Série de cultures No 1	6,6			5,6			5,3	3,6
" " " No 2	6,5			6,0			5,4	
" " " No 3		6,5	6,8		6,5	6,2		
" " " No 4		7,2	6,8		6,8	6,6		

Le tableau II montre que l'addition de sérum au milieu n'améliore, en aucune façon, le rendement de la culture, les titres de virulence étant sensiblement égaux pour des concentrations étagées de 0% à 8%.

Bien plus, il semble qu'à des concentrations plus fortes de 10% et 15% le sérum soit un facteur défavorisant.

A cela une explication pourrait être donnée. Assez fréquemment, les sérums de bovins n'ayant subi aucune vaccination ni aucun contact avec le virus, révèlent des taux d'anticorps neutralisant peu élevés, de l'ordre de $10^{0,15}$ à $10^{0,60}$, et qui sont considérés comme non spécifiques. Il se peut donc que ces anticorps manifestent leur présence dans les cultures, en inhibant dans une certaine mesure la croissance de virus, lorsque la quantité de sérum ajoutée au milieu devient très importante.

En fait, le phénomène est probablement plus complexe, comme le montre l'expérience suivante. Les courbes de croissance d'un virus A sont établies à l'aide de trois cultures conduites dans les conditions suivantes :

Boîte de Roux de 1 000 ml
Volume de la suspension cellulaire : 100 ml
Solution saline : Earle (pH 7,6)
Concentration de la suspension cellulaire; 1/100
Sérum de veau ayant un titre de séro-neutralisation de $10^{0,45}$: 0%, 5%, 10%
Virus : A Eystrup
Titre initial de virulence des cultures : $10^{3.8}$
Titrage de virulence des cultures établis à des temps variables allant de 2 à 30 heures.

Les résultats de cette expérience sont représentés dans la figure 3, où sont portés, en abscisse, les moments des titrages exprimés en heures et, en ordonnée, les log des titres de virulence correspondants.

La figure 3 montre que les trois courbes de croissance sont superposables et que la présence d'un sérum possédant des anticorps non spécifiques et utilisé jusqu'à une concentration de 10% n'a modifié en rien la production du virus. Ce fait contredit donc, dans une certaine mesure, celui qui se dégageait du tableau.

Aussi, en conclusion, nous dirons que le sérum n'est nullement indispensable à une bonne production de virus et que, si on l'emploie il peut provoquer, dans certains cas, à forte concentration, une certaine inhibition de la culture, sans que l'on sache pourquoi.

IV. Influence de la hauteur du sédiment cellulaire

Les suspensions cellulaires étant "stationnaires", les cellules se déposent nécessairement au fond des flacons et il est permis de penser que les plus profondément situées se trouvent dans des conditions moins favorables de survie que les plus superficielles et donc moins aptes à la culture du virus. En d'autres termes, il se pourrait que, à quantité égale de cellules en suspension, la production de virus ait tendance à diminuer lorsque la hauteur du sédiment cellulaire augmente.

Pour préciser ce point, deux séries de quatre cultures sont conduites dans les conditions suivantes :

Flacons de diverses formes mais de volume égal : 500 ml
Volume de la suspension cellulaire : 50 ml
Solution saline : Earle (pH 7,6)
Concentration de la suspension cellulaire : 1/100
Virus : O Flandre
Titre initial de virulence des cultures : $10^{3,8}$
Titrage final : effectué à la 24e heure.

Les volumes de la suspension cellulaire et des flacons étant toujours les mêmes, mais la forme des derniers étant variable, la hauteur du sédiment a varié d'un flacon à l'autre. Or il est difficile d'apprécier les hauteurs des sédiments avec exactitude et donc de les comparer parce que la ligne de séparation entre le sédiment proprement dit et le liquide surnageant n'est jamais nette. Pour tourner la difficulté, nous mesurons les surfaces de sédimentation qui sont celles des fonds des flacons; le rapport entre les surfaces étant inversement proportionnel au rapport entre les hauteurs des sédiments, une comparaison devient possible entre ces derniers.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau III.

Figure III

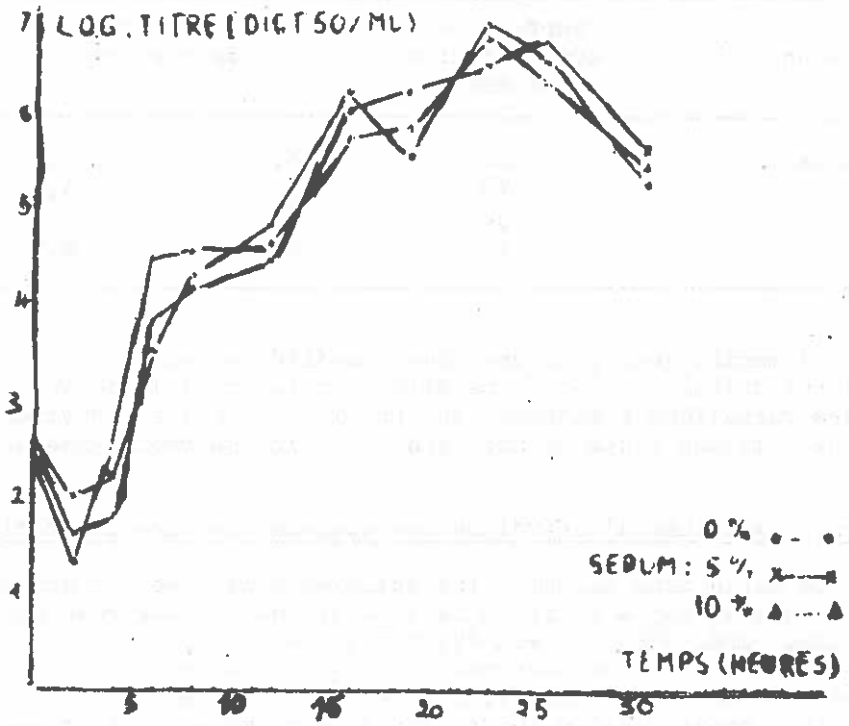


Figure IV

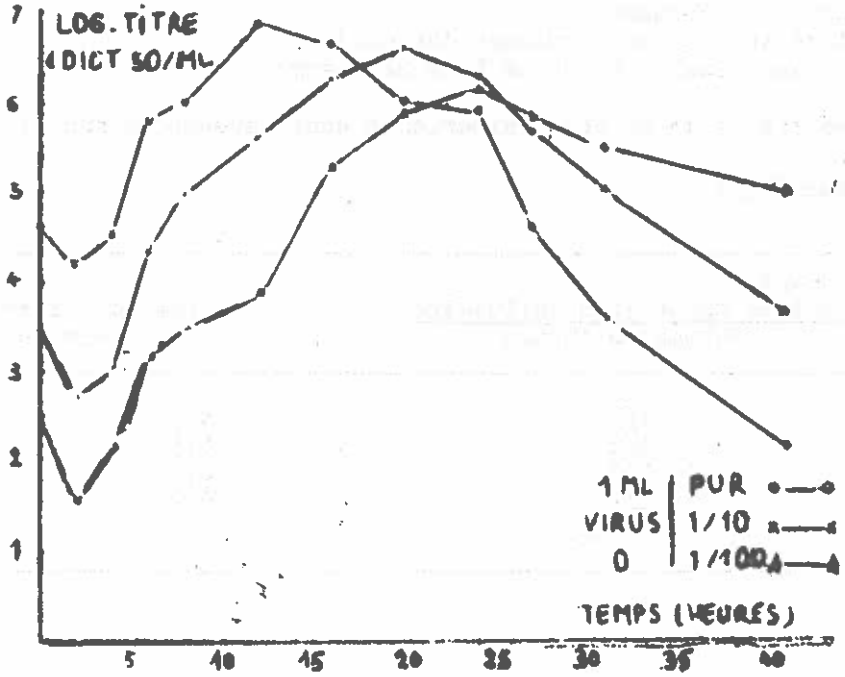


TABLEAU III

Flacon	Surface de sédimentation en cm^3	Log. du titre final de virulence	
Boîte de Roux	144	6,3	6,5
Erlenmeyer	78	6,5	6,4
Fourneau	50	6,2	6,7
Ballon	19	6,3	6,2

Le Tableau III montre que, pour une même quantité de cellules, les variations de hauteur du sédiment cellulaire sont sans effet sur la quantité de virus produite, au moins lorsque ces variations n'excèdent pas un rapport de 1 à 8 environ (144/19). Cela laisse donc une latitude assez grande dans le choix des récipients destinés aux cultures.

V. Influence du rapport volume d'air/volume des suspensions dans les récipients

La solution de Earle dans laquelle les cellules sont mises en suspension, abandonne nécessairement du CO_2 à l'air du récipient; son pH augmente donc légèrement et d'une manière quasi immédiate. Il est évident que si le volume d'air du récipient est petit par rapport à celui de la suspension, la quantité de CO_2 abandonnée par cette dernière est petite et l'élévation immédiate de son pH peut devenir négligeable. Il s'ensuit que le milieu, conservant au départ une valeur basse de pH, s'acidifiera plus rapidement sous l'action des cellules en survie et deviendra moins apte à la croissance du virus.

On peut donc se démander, dans quelle mesure, le fait de mettre plus ou moins de suspension cellulaire dans un récipient de volume donné, peut influer sur la production du virus.

Deux séries de quatre cultures sont conduites dans les conditions suivantes :

Fioles graduées de 500 ml
Volume variable de la suspension cellulaire allant de 50 ml à 400 ml
Solution saline : Earle (pH 7,6)
Concentration de la suspension cellulaire : 1/100
Virus : O Flandre
Titre initial de virulence des cultures : $10^{3,8}$
Titrage final : effectué à la 24e heure.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Rapport = Volume suspension cellulaire / Volume du flacon	Log. du titre final de virulence	
1/10	6,8	6,5
1/5	6,5	5,8
1/3	6,2	6,3
1/2	6,2	
1/1,25		4,8

Le tableau IV montre que la production de virus diminue légèrement lorsque le volume de la suspension cellulaire augmente par rapport au volume du récipient. Mais cette diminution ne devient vraiment sensible qu'à partir du moment où la suspension cellulaire occupe plus de la moitié du volume du récipient.

VI. Influence de la quantité de virus ensemencé

On pourrait penser que, pour une suspension cellulaire donnée, quelle que soit la quantité ensemencée, la production du virus serait toujours la même, sous réserve de prolonger le temps de culture suffisamment longtemps.

En fait, nous avons déjà rappelé à propos de l'influence de la composition saline du milieu, que cette production dépendait, dans une certaine mesure, du rapport entre la vitesse de croissance du virus et celle de l'acidification du milieu. Comme la vitesse de croissance du virus est elle-même en fonction directe de la quantité ensemencée, il s'ensuit que si cette quantité est faible, l'acidification du milieu se produira et arrêtera la culture avant que celle-ci n'ait atteint son complet développement.

Et c'est bien ce que montre l'expérience qui consiste à établir les courbes de croissance de cultures ensemencées avec des quantités variables de virus.

Trois cultures sont conduites dans les conditions suivantes :

Boîtes de Roux de 1 000 ml
Volume de la suspension cellulaire : 100 ml
Solution saline : Earle (pH 7,6)
Concentration de la suspension cellulaire : 1/100
Virus : O Flandre
Titres initiaux de virulence des cultures : $10^{4,7}$, $10^{3,7}$, $10^{2,7}$
Titrages successifs : à des temps variables allant de 2 à 40 heures.

Les résultats de cette expérience sont représentés dans la figure 4, où sont portés en abscisse, les moments des titrages, exprimés en heures et, en ordonnée, les log des titres de virulence correspondants.

Les courbes de la figure 4 montrent bien que les quantités de virus obtenues sont d'autant plus grandes et le sont dans un délai d'autant plus court, que la quantité de virus ensemencé est, elle-même, d'autant plus grande. Pratiquement, les meilleurs résultats sont obtenus, en une douzaine d'heures, avec un titre de virulence initial d'environ 10^4.

POUVOIR IMMUNOGENE DU VIRUS OBTENU PAR CULTURE EN SUSPENSION CELLULAIRE STATIONNAIRE

Ce pouvoir immunigène peut être apprécié de diverses manières. Mais pour que l'appréciation puisse permettre, éventuellement, des comparaisons interprétables avec d'autres virus, il importe qu'elle soit quantitative. De ce point de vue, là encore, on peut utiliser plusieurs méthodes.

Celle que nous choisissons est la suivante : nous caractérisons le pouvoir immunogène par la quantité nécessaire et suffisante de virus qui, après transformation en vaccin, est susceptible de conférer au boeuf une immunité d'une valeur donnée. Cette valeur est tout indiquée : c'est celle qui a été officiellement adoptée en France comme caractérisant l'efficacité minimale requise pour les vaccins antiaphteux de la classe I et qui, s'exprimant par l'Indice de protection K, est telle que l'on a log K au moins égal à 1,2 (1).

Dans ces conditions la détermination de la quantité de virus cherchée se fera on prenant, au minimum, trois quantités différentes de virus, de telle façon que les valeurs des immunités exprimées en log K qu'elles conféreron au boeufs après leurs transformation en vaccin, encadrent celle de 1,2.

Là encore le choix des trois quantités de virus peut être orienté. Nous savons, en effet, que, si les conditions de préparation du vaccin sont correctes, avec $10^{6,5}$ $DICT_{50}$ par dose vaccinale, le taux de protection probable du boeuf est d'environ 30 à 40 pour cent; qu'avec $10^{7,5}DICT_{50}$ il est d'environ 80 à 90 pour cent; qu'avec $10^{8}DICT_{50}$ il est d'environ 90 à 100 pour cent(5). Et nous savons, d'autre part, qu'au taux de protection du boeuf de 30 à 40 pour cent correspond un log K inférieur à 0,6: qu'à celui de 80 à 90 pour cent correspond un log K voisin de 1,2: qu'à celui de 90 à 100 pour cent correspond un log K supérieur à 1,8 (7).

Sur ces bases nous préparons trois vaccins, selon la formule indiquée plus haut. Avec chacun d'eux, nous vaccinons 4 boeufs. Trois semaines plus tard nous déterminons la valeur de l'Indice K sur chaque groupe.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau V.

TABLEAU V

No du vaccin	Log. du nombre de $DICT_{50}$ par dose vaccinale	Log.K	Qualification du vaccin selon les normes officielles françaises (1)
VS 1 type O Flandre	7,8	1,8	accepté -- classe I
VS 2 type O Flandre	7,5	1,58	accepté -- classe I
VS 3 type O Flandre	6,5	0,56	refusé

Le tableau V montre, qu'avec un minimum d'environ $10^{7,5}$ $DICT_{50}$ par dose vaccinale, on peut obtenir un vaccin dont l'activité est supérieure à l'activité minimale requise tout en étant très voisine. Cette quantité correspond donc assez bien à la quantité nécessaire et suffisante que nous cherchions, et permet de caractériser le pouvoir immunogène du virus produit en suspension cellulaire stationnaire.

CONCLUSION

La culture du virus aphteux en "suspension cellulaire stationnaire" ne présente aucune difficulté.

Les conditions optimales de simplicité et de rendement des cultures que nous avons adoptées sont les suivantes :

Les cellules de rein de veau, obtenues par trypsination, sont mises en suspension à 1/100 dans la solution saline de Earle à pH 7,6. La suspension est répartie en flacons qui peuvent être de formes très diverses, à la condition toutefois que son volume n'excède pas la moitié de celui des flacons. L'ensemencement en virus de la suspension est fait de manière à ce que le titre initial de virulence soit de l'ordre de $10^{4}DICT_{50}$ ml. La suspension ensemencée est mise à l'étuve à 37°C, sans autre condition particulière. Au bout de 18 à 20 heures, le titre de virulence atteint une valeur voisine de $10^{7}DICT_{50}$ml, montrant que la production de virus correspond à environ 1 000 fois la quantité ensemencée.

Le virus obtenu par cette méthode possède un pouvoir immunogène dont la valeur est d'environ $10^{7,5}$. Cela veut dire que la quantité de virus nécessaire et suffisante pour obtenir un vaccin dont l'activité correspond à l'activité minimale requise, en France, pour les vaccins de la classe I, est de $10^{7,5}DICT_{50}$ par dose vaccinale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arrêtés Ministériels des 8 juin 1965 et 24 décembre 1965. (J.O. des 28 juin 1965 et 31 décembre 1965).

2. Babini A. : La coltura del virus aftoso in sospensioni de cellule renali di bovino tripsinizzate. Vet. Ital, 1962, 13, 570-575.

3. De Boer C.J. et Bachrach H.L. : The multiplication of Foot-and-Mouth disease virus in trypsinized calf kidney and tongue cells and its use as immunizing and complement fixing antigens. J. Immunol., 1961, 86, 282-291.

4. Gramenzi F. et Rossi G.A. : Osservazioni sulla produzione del virus dell'afta in coltura sommersa di cellule di rene bovino. Vet. Ital., 1962, 13, 576-587.

5. Henderson W.M., Lucam F. et García Pirazzi A. : Le contrôle des vaccins antiaphteux à virus inactivé - Solution adoptée en Amérique du Sud. Symposium Internat. Virologie Animale (Office Internat. Epizooties et Assoc. Internat. Soc. Microbiol.) Lyon, France, 23-24 mai 1962, p. 71-88.

6. Lépine P., Slizewicz P., Daniel Ph. et Paccaud M. : Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés. Ann. Inst. Past., 1956, 90, 654-656.

7. Lucam F., Fedida M. et Dannacher G. : Le contrôle officiel des vaccins français antiaphteux. FAO, Commission Européenne de lutte contre la Fièvre aphteuse. Lyon - France, 28 septembre, 1er octobre 1965.

8. Mazzaracchio V., Orfei Z., Tiecco G. et d'Amore A. : Su alcune esperienze per la coltivazione del virus aftoso su cellule in sospensione. C.R. Acad. Nat. Lincei, 1961, 31, 143, 144.

9. Patty R.E., Bachrach R.L. et Hess W.R. : Growth of foot-and-mouth disease virus in bovine kidney cell suspensions. Am. J. Vet. Res., 1960, 21, 144-149.

10. Patty R.E., Tozzini F., Seibold H.R. et Callis J.J. : Growth of foot-and-mouth disease virus in dispersed tissue celles. I. Method of production. Canad. J. Compar. Med. Vet. Sci., 1962, 26, 186-192.

11. Sandford K.K., Earle W.R., Evans W.J., Waltz H.K. et Shannon H.E. : The measurement of proliferation in tissue culture by enumeration of cell nuclei. J. Nat. Cancer Inst., 1951, 11, 773-795.

12. Tozzini F. et Zavagli V. : Produzione su vasta scala di virus dell'afta epizootica, metodo di coltura stazionaria su sospensioni cellulari. Zooprofilassi, 1962, 77, 571-583.

13 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, 202-205.

ANNEXE 7

PRODUCTION DE VACCIN ANTIAPHTEUX SUR CELLULES BHK 21

par

P.B. Capstick et R.C. Telling*

PRODUCTION DE L'ANTIGENE DU VIRUS

Cuves de culture. Trois cuves de culture agitées d'une capacité nominale de 4 l, 30 l et 100 l, ont été construites. Ces cuves sont semblables dans leur conception à celles utilisées pour les cultures profondes de bactéries. Chacune d'elles est agitée par une simple turbine à impulsion et dans les deux plus grandes sont disposées, en chicane, quatre cloisons verticales montées radialement sur les parois de la cuve. Les cuves sont équipées de régulateurs de température et de pH et stérilisées in situ par injection de vapeur. Les cuves sont conçues et manoeuvrées de façon à minimiser le risque d'entrée et de sortie du matériel contaminé et, en conséquence, elles sont également appropriées à la culture de cellules ou de virus.

Cellules. Il s'agit d'une souche en suspension dérivée de BHK 21 Cl. 13; elles sont stockées à -65°C en utilisant comme conservateur le diméthylsulfoxyde, par fractions de 20 ml contenant 2 x 10^9 cellules. Pour une production courante, les cellules extraites de cette bande seraient revivifiées toutes les 4 à 6 semaines.

Croissance cellulaire. Le milieu utilisé pour la culture cellulaire en suspension est un milieu fondamental de Eagle modifié, additionné de bouillon de phosphate de tryptose dans la proportion de 10 pour cent et de sérum bovin, dans la même proportion. De la carboxyméthylcellulose sodique (Edifas B50) et du Silicone Antifoam RD sont également ajoutés pour donner des concentrations finales de 1 g/l et 0,2 ml/l respectivement.

Les cultures cellulaires sont maintenues à 35°C et au pH 7,4; partant d'une concentration de 0,5 x 10^6 cellules/ml, on atteint un maximum d'environ 2,5 x 10^6 cellules/ml en 50 heures.

Production de cellules à grande échelle. Jusqu'ici cette production a été obtenu de façon satisfaisante jusqu'à une échelle de 30 l et elle doit, d'ici peu, être tentée sur une échelle de 100 l. Une méthode commode consiste à greffer les cellules prélevées dans la banque de cellules congelées, dans la cuve de culture de 4 l et, lorsque la concentration cellulaire maximum est presque atteinte, à les faire passer dans la cuve de 30 l par la voie d'un tuyau d'acier inoxydable stérile en utilisant de l'air sous pression. Ceci a été fait avec succès et la même méthode sera employée pour greffer les cellules dans les cuves de 100 l à partir de celles de 30 l. De cette façon il doit être possible de produire 100 l de cellules en 7 jours environ, ce qui représenterait une augmentation du centuple des cellules par rapport au nombre de celles prélevées dans la banque de cellules. L'avantage de la méthode d'ensemencement en cascade est que, une fois la cuve de 4 l ensemencée, la production cellulaire se fait en circuit fermé, ce qui réduit les risques de contamination; par ailleurs, le transfert se fait rapidement et la méthode nécessite peu de travail ou d'appareillage. Les cellules se sont toujours développées lorsqu'elles ont été ensemencées à partir de la banque de cellules, dans la cuve de 4 l mais, dans certains cas, la multiplication a commencé avec un retard pouvant atteindre 24 heures.

---

* Animal Virus Research Institute, Pirbright, Surrey, Angleterre

Renouvellement du milieu. Il est nécessaire de remplacer le milieu utilisé pour la multiplication des cellules avant d'infecter celles-ci par le virus. La méthode des centrifugations fractionnées ne convient pas pour une utilisation à plus grande échelle, et nous avons élaboré une méthode de sédimentation des cellules pendant la nuit. La culture cellulaire est refroidie à environ 20°C avant le début de la sédimentation, encore qu'il puisse y avoir avantage à refroidir davantage, c'est-à-dire jusqu'à +4°C. Après 16 à 18 heures de sédimentation, 90 pour cent du milieu usé est évacué, du milieu frais est ajouté, et les cellules sont remises en suspension, 90 pour cent des cellules retrouvent leur vitalité et 90 pour cent d'entre elles environ sont capables de se développer avec du trypan bleu.

Culture de virus. Les conditions générales pour la culture du virus sont les suivantes :

Température	35°C
pH	7,2
Virus affectant/apport cellulaire	1:1 à 1:10
Sérum	de bovin ou de cheval, aussi approprié
Durée de la culture	48 heures

Le milieu utilisé est le même que celui employé pour la culture cellulaire, sauf qu'il ne contient pas d'Edifas B et que la concentration est de 5 pour cent.

Enlèvement des cellules et débris cellulaires. On pratique couramment la filtration en deux temps pour descendre à 0,2 environ. Dans le premier temps on filtre sur épaisseur de cellulose pure, et dans le deuxième temps sur membrane de nitro-cellulose. Les constituants des deux types de filtres sont neutres et non adsorbants, et on n'a pas décelé de perte de virus ou de titre de fixation du complément, ni de modification du pH.

Les travaux effectués jusqu'à ce jour indiquent qu'avec le rapport volume = $\frac{3 \text{ ml}}{1 \text{ cm}^2}$ pour chacun des appareils à filtrer, surface de filtration, 30 litres de culture de virus peuvent être filtrés en 30 minutes.

Inactivation. Elle est réalisée dans une cuve de culture agitée. Les conditions d'inactivation sont les suivantes :

Inactivant	AEI jusqu'à une concentration finale de 0,05 pour cent v/v
Température	25°C
pH	7,6
Durée	30 heures

Multiplication de différentes souches de virus. Plusieurs souches différentes de virus aphteux ont été multipliées en utilisant ce système de culture. La moyenne des titres de virulence de quelques souches de virus, ainsi que de leur pouvoir de fixation du complément sont indiqués au Tableau 1. On n'a pas essayé d'obtenir une adaptation totale de ces souches de virus aux cellules BHK21, et lorsque l'on a utilisé des cultures en suspension on a effectué cinq à dix passages du virus ne couches monocellulaires BHK. Tous les virus que nous avons examinés ne se multiplient pas de la même façon dans les cultures en suspension, comme l'indiquent les variations des titres de virulence et de fixation du complément figurant au tableau.

Les souches de virus,que nous avons examinées, peuvent être divisées en trois catégories sur la base de leur pouvoir antigénique chez les bovins. Ces catégories apparaissent au Tableau 2 avec quelques exemples. Il est intéressant que nous n'ayons pas encore trouvé une souche de virus qui, se développant faiblement en suspension, soit un bon antigène chez les bovins. La réciproque n'est cependant pas vraie, et toutes les souches qui se développent bien en suspension ne sont pas nécessairement d'excellents antigènes chez les bovins.

Essais de vaccins chez les bovins. Notre objectif, en évaluant l'antigène de BHK21, était de nous assurer si ce procédé de culture produisait un antigène efficace à partir de souches naturelles variées, dont certaines seraient de sous-type inconnu et pourraient avoir un faible pouvoir immunigène. Il a été également considéré comme souhaitable d'apprécier l'effet de la réduction de volume d'une dose et de l'augmentation de la puissance du vaccin par l'utilisation d'un adjuvant saponiné si possible. Pour un grand nombre de nos expériences sur les bovins, nous avons choisi des souches de virus dont nous connaissons le faible pouvoir d'immunisation (par exemple Bec.1/65 ou A/Irak 24/64) afin de déterminer le rendement le plus bas possible de la méthode.

Des expériences préalables effectuées avec 5 vaccins préparés avec la souche A119 ont montré qu'une protection à 100 pour cent des bovins pouvait être obtenue par l'emploi de la dose conventionnelle de 15 ml de vaccin au gel d'alumine contenant 7,5 ml d'antigène viral. La formation d'anticorps en réponse à ces vaccins a été assez importante pour suggérer que 1 ml d'antigène était suffisant et cette dose a été employée pour rechercher l'effet dose-volume sur la protection des animaux et la formation d'anticorps. Les résultats sont indiqués au Tableau 3. Chacun de ces vaccins contenait 1 ml d'antigène de virus avec des titres de $10^{8.1}$ pfu/ml et 100 unités fixant le complément /ml. La dose protectrice 50 pour cent, du vaccin saponiné 5 ml, a été bien inférieure à 0,03 ml et elle a été avec 5 ml de vaccin au gel d'alumine de 0,06 ml. Les différences dans le taux des anticorps, entre les vaccins ayant des volumes de 5 et 15 ml, ne sont sans doute pas significatives. Une protection et des taux d'anticorps acceptables ont été obtenus avec 1 ml d'antigène dans une dose de 5 ml de vaccin.

L'effet d'adjuvants saponinés dans une dose de 5 ml de vaccin est démontré le plus nettement par les expérimentations utilisant deux souches de faible pouvoir antigénique des virus Bec.1/65 et A/Irak 24/64. Les résultats sont indiqués au Tableau 4 et montrent que des taux de protection satisfaisants peuvent être obtenus avec 1 ml d'antigène, si l'on utilise la saponine comme adjuvant.

DISCUSSION

Toute méthode de production de virus utilisée pour remplacer la culture d'épithélium lingual doit être au moins aussi efficace et ne doit pas en présenter les inconvénients. La plupart de ces inconvénients peuvent être ramenés à la difficulté et au coût d'obtention des épithéliums linguaux en grande quantité, ce qui limite l'expansion de la production de vaccin dans certaines régions du monde. La culture de cellules BHK21 en suspension profonde permet d'obtenir rapidement un substratum cellulaire qui peut être stocké pendant longtemps sous forme de banque de cellules. On peut rechercher les souillures étrangères d'origine bactérienne et virale, sur cette banque de cellules dont on connaît par ailleurs la sensibilité au virus aphteux. Les cellules peuvent, à partir de cette banque, être facilement multipliées à une échelle industrielle dans un dispositif stérile nécessitant relativement peu de main-d'oeuvre. Quatre personnes peuvent faire fonctionner une usine travaillant sur une échelle de 100 litres (3,5 millions de doses par an) et effectuer les essais de virus ainsi que le contrôle de cellules (à l'exclusion des essais de virus sur bovins).

Les antigènes produits par cette méthode sont des agents immunisants efficaces et ne le cèdent en rien aux antigènes du type Frenkel. Même avec des virus connus pour leur faible pouvoir immunisant, 1 ml de liquide de culture produira chez les bovins une protection et des taux d'anticorps suffisants.

Tableau 1 - Titres moyens d'infectivité et de pouvoir de fixation du complément de quelques souches de virus aphteux de culture en suspension profonde BHK21 CL13

TYPE	SOUCHE	Pouvoir pathogène pour bovins	Titre infectieux maximum/ml x log 10	Pouvoir complémentaire maximum/ml
A	119	Virulent	8,3	130
A	Irak 24/64	"	8,0	170
O	Israël 1/65	"	7,9	100
SAT1	Turquie 43/62	"	7,3	60,0
SAT3	Bec. 1/65	"	7,9	40,0
ASIA1	Pak. 1	"	8,2	190
SAT1	RV.11 mo.	Atténué	8,2	N.D.
SAT1	Turquie 43/62 BHK89	"	8,0	N.D.

Tableau 2 - Classification du potentiel de multiplication et de la qualité immunisante du virus aphteux de culture en suspension profonde

Etat antigénique bovin	Multiplication en suspension	Souche de virus
Bon	Bon	'O' Israël 1/65
Faible	Bon	A/Irak 24/64
	Faible	Bec. 1/65

Tableau 3 - Effet du volume de la dose sur la protection des bovins et le taux d'anticorps

Volume de la dose	ADJUVANT					
	SAPONINE		ALHYDROGEL		ALHYDROGEL + SAPONINE	
	Protégés	G.M. A/B	Protégés	G.M. A/B	Protégés	G.M. A/B
15 ml	4/4	3,6	4/4	2,3	4/4	3,1
5 ml	4/4	2,9	4/4	1,9	4/4	3,1

Tableau 4 - Effet de différents adjuvants sur la puissance de trois antigènes aphteux

TYPE DE VIRUS	DOSE BOVINE		ADJUVANT					
			ALHYDROGEL		SAPONINE		ALHYDROGEL + SAPONINE	
	Infectivité en: pfu's*	CFU'S*	Protégés	G.M.* anticorps	Protégés	G.M.* anticorps	Protégés	G.M.* anticorps
SAT3 Bec.1/65	$10^{6.7}$	20	0/4	1,2	-	-	4/4	1,9
A/Irak 1/64	$10^{6.6}$	170	2/4	1,3	4/4	2,3	-	-
'O' Israël	$10^{8.0}$	102	4/4	1,9	4/4	2,9	4/4	3,1

* G.M. = Moyenne géométrique d'anticorps du groupe

* pfu's = Unités formant plage par ml

* cfu's = Unités fixant le complément.

ANNEXE 8

LES VARIATIONS DE TYPE DU VIRUS APHTEUX EN COURS D'EPIZOOTIE

par

Dr G.A. Moosbrugger *

La variation du type du virus aphteux en cours d'épizootie est maintenant un fait qui semble bien établi. Mais sa rareté n'en facilite ni l'étude, ni la compréhension. Le nombre des observations publiées est en effet très restreint, soit que les variations elles-mêmes soient peu fréquentes, soit en raison de la difficulté de les dépister au moment de leur apparition. Une bibliographie très complète et une étude historique exhaustive se trouvent déjà dans le mémoire de A. Heinig (Beitrag zur Variabilität des Maul- und Klauenseuchenvirus, Archiv für experim. Vet. Medizin Bd XVI H 5/62 pages 977 à 1089) auquel nous renvoyons pour ne pas répéter des indications déjà connues. Nous-mêmes d'ailleurs avions présenté en 1959 lors de la VIIIème réunion de la Commission permanente de la fièvre aphteuse de l'O.I.E. un rapport sur le même sujet (Bulletin de l'O.I.E. T. 49 No 1-2 1958).

C'est précisément la rareté des observations suffisamment fondées qui rend nécessaire d'en communiquer le plus grand nombre possible. Il est clair que la plupart d'entre elles sont lacunaires et de ce fait sans valeur démonstrative à elles seules. Leur répétition néanmoins leur donne un intérêt qui n'est pas négligeable, car chacune possède quelques éléments communs qui à la longue permettront peut-être d'y voir plus clair. L'étude de ces variations s'achoppe à des obstacles d'importance variable dont nous allons énumérer les principaux.

Tout d'abord la détermination du type de tous les foyers se heurte très vite, avec le développement d'une épizootie, à des difficultés pratiques croissantes. Alors que dans les premiers cas, les prélèvements sont expédiés sans délai et doublés par le matériel provenant des abattoirs, leur nombre diminue lorsque les contaminations répétées, où les contacts sont évidents, font paraître la vérification comme superflue ou tout au moins pas immédiatement nécessaire. En effet, sur le terrain, les vétérinaires subissent une augmentation rapide de leur travail et ne trouvent plus guère le temps de procéder au prélèvement et à l'expédition, alors que les abattoirs un peu débordés par les abattages supplémentaires ne sont pas régulièrement en mesure de procéder à des opérations multipliées et qui seront délaissées au bénéfice de tâches plus urgentes. C'est ainsi que du 24 octobre 1965 au 15 avril 1966 pour 900 foyers, du matériel a été envoyé 547 fois soit un peu plus d'une fois sur deux.

Or ces prélèvements se feront surtout au début de l'épizootie, lorsque les foyers sont encore isolés, ou à la fin quand ils apparaissent en grande partie sur des animaux fraîchement vaccinés. Il en résulte d'une part que, normalement, c'est au moment où la pleine expansion, par ses passages rapides, devrait faire apparaître une modification, que les renseignements seront les plus lacunaires, et que d'autre part, du fait de la vaccination, le nombre des cas indéterminables aura tendance à croître, sans qu'il soit possible de savoir si les échecs sont dus à l'effet du vaccin ou au virus lui-même. En effet Heinig a observé qu'au moment du virage la fixation d'alexine devient négative pendant un ou deux passages lorsqu'elle est faite avec les couvercles d'aphtes, surtout lorsque le virus est inactivé ce qui est le cas normal dans les examens de routine.

Une dernière difficulté est celle du prélèvement. Lorsque la maladie est à son tout début, les petits aphtes isolés qui permettent certes d'assurer le diagnostic ne fournissent avec peine que quelques lambeaux de muqueuse rarement suffisants. Au cours de la dernière épizootie, l'opération s'est compliquée du fait qu'assez souvent seuls les espaces interdigités et les trayons ont été atteints, les lésions sur la langue

* Institut des vaccins, Hagenaustrasse 74, Bâle, Suisse

étant des plus discrètes, ou même totalement absentes. Enfin, pour nombre de foyers porcins, le matériel que nous avons reçu n'était pratiquement pas utilisable. C'est ce qui explique la relativement haute proportion de 12% de résultats négatifs ou illisibles obtenus au cours de ces trois mois, alors que les conditions géographiques de la Suisse permettent des envois rapides dans les meilleures conditions. A cela s'ajoutera toujours l'inexactitude involontaire et les déficiences ou lacunes des renseignements qui sont réunis sur le terrain et qui souvent ne peuvent fournir aucune indication sur les points mêmes qui se démontreront plus tard essentiels.

De ce qui précède il ressort que pour observer sur le terrain une modification de type et surtout pour saisir avec suffisamment de précision le moment du virage, il faut un ensemble de circonstances favorables qui ne peuvent se rencontrer que très rarement. Or c'est précisément leur répétition qui serait démonstrative. Car en laboratoire, les risques de contamination secondaire sont trop élevés pour qu'un doute ne subsiste pas toujours.

Déjà en 1958 nous avions relevé que l'apparition de types différents de l'épizootie en cours dans les régions contaminées ou en bordure de celles-ci ne s'expliquaient pas de façon satisfaisante par une simple contamination nouvelle et totalement indépendante. Nous disions alors textuellement : "Rester à trouver une autre explication qui ne soit ni la mutation, trop hérétique, ni les infections multiples, trop invraisemblables. Nous avouons notre échec et aurions été heureux de trouver quelqu'un qui nous fournisse ce que nous avons été incapables de découvrir par nous-mêmes. Nous avons trouvé un scepticisme poli, mais pas d'éclaircissement valable et qui réponde aux faits."

Toutefois, entre-temps, diverses observations nous incitent à proposer, ou plus exactement à suggérer, en tous cas pour une partie de ces foyers de types différents, une troisième explication à vrai dire passablement hypothétique. Il ne serait pas exclu que, dans des régions apparemment indemnes de fièvre aphteuse, certains animaux soient infectés de façon latente et qu'une nouvelle attaque du virus fasse apparaître non pas le second, responsable de l'éclosion des symptômes visibles mais le premier, responsable du type. Que des infections latentes soient possibles, les observations de Leunen et de Henderson en font foi. D'autre part qu'un certain nombre des cas de maladie décelés dans les dix jours après vaccination puissent leur être attribués est plus que vraisemblable et nous en verrons des exemples nouveaux plus loin. Le fait nouveau serait qu'un virus aphteux, incapable de faire apparaître l'affection à lui seul soit néanmoins en mesure d'imposer son type à un autre virus d'origine externe qui ne jouerait plus qu'un rôle de déclenchement. Là aussi la multiplication des observations s'impose, car ces dernières ne peuvent être jusqu'à présent que fortuites et il ne semble à première vue guère facile de les provoquer expérimentalement.

C'est pourquoi, ainsi que nous l'avons dit plus haut, nous estimons utile faire connaître tous les faits que nous avons observés, et cela de façon aussi détaillée que nous le pouvons, sans nous soucier par trop des déficiences qu'ils font apparaître et dont nous sommes pleinement conscients.

I. Première observation dans la vallée du Rhône (carte I)

Le 21 octobre 1965 la fièvre aphteuse est déclarée dans une ferme de Brent au-dessus de Vevey, simultanément sur les bovins et les porcs. Il s'agit de type O que ses caractéristiques sérologiques permettront plus tard de rattacher à l'infection qui se manifeste depuis un mois en Hongrie. En 1962, dans la même étable, le type C avait été décelé. Déjà le 23 octobre un second foyer est annoncé à Bex, la liaison par contact avec le premier étant bien établie. Il est aussi de type O. Le 30 octobre, second foyer à Bex mais, bien que le matériel ait été prélevé aux abattoirs et soit constitué par des couvercles d'aphtes bien formés, le type ne peut être déterminé à la déviation de complément. Les animaux avaient été vaccinés le 24 octobre. Le 9 novembre un foyer se déclare à St. Triphon sur des animaux non traités. A l'examen sérologique on peut reconnaître un type O très faible. Deux jours plus tard, le 11 novembre à Noville la fièvre aphteuse apparaît sur des porcs non vaccinés.

Le premier prélèvement sur le terrain ne donne pas un résultat interprétable, en revanche le matériel provenant des abattoirs démontre l'existence du type C. Un second foyer, par contact direct à Noville, le 16 novembre, confirme le type C. Le même type C se manifeste dans le troisième foyer de Bex, le 20 novembre, sur des animaux vaccinés 20 jours auparavant mais où aucun nodule ne s'est formé et le 25 novembre à Ollon où sur 14 animaux deux ne présentent pas de nodule d'inoculation, cinq ont été inoculés par voie intra-musculaire, deux partiellement intra-musculaire, et cinq seulement possèdent un nodule normal, sous-cutané et de bonne grosseur. Ce type C se répandra encore à Leysin le 9 décembre et enfin à Brent sur des porcs non vaccinés le 18 janvier 1966 sans que la voie de transmission ait pu être déterminée. On voit donc, foyer après foyer, dans cette région bien délimitée, le type O perdre son caractère spécifique et virer au type C qui se stabilise puis disparaît et ne reparaît plus. Un seul foyer de type indéterminable faute d'aphtes bien développés ayant été annoncé entre-temps à Bex le 9 décembre.

II. Deuxième observation dans la vallée de l'Ergolz (carte II)

Le 25 octobre 1965, dans une exploitation de Schönenbuch la fièvre aphteuse est constatée sur les bovins et les porcs et son origine est probablement la même qu'à Brent car il s'agit du même virus O. Il n'y a pas de liaison autre entre ces deux éclosions séparées par la largeur de la Suisse alors totalement indemne. Le contage est transmis par mouvement de personnes bien défini à Dietgen, un prélèvement le 3 novembre de type O, et de là à Lausen le 15 novembre, type O et à Itingen, trois prélèvements toujours de type O les 21 et 25 novembre et le 7 décembre. Le 8 décembre, sur les deux vaches d'une petite ferme isolée de Lausen, animaux en mauvaise condition et vaccinés le 18 octobre bivalent OC Waldmann, la maladie se déclare. Elle est de type C.

Il est bien clair qu'une infection de l'extérieur est toujours possible, mais, comme en 1956 il est extraordinaire que pour la seconde fois en un mois elle se manifeste exactement dans les régions où la maladie est bien délimitée et ne s'étendra plus. Il n'y a pas d'autres foyers de type C ni en Suisse ni dans les deux régions limitrophes et l'épizootie de type O sévit sur le plateau Suisse.

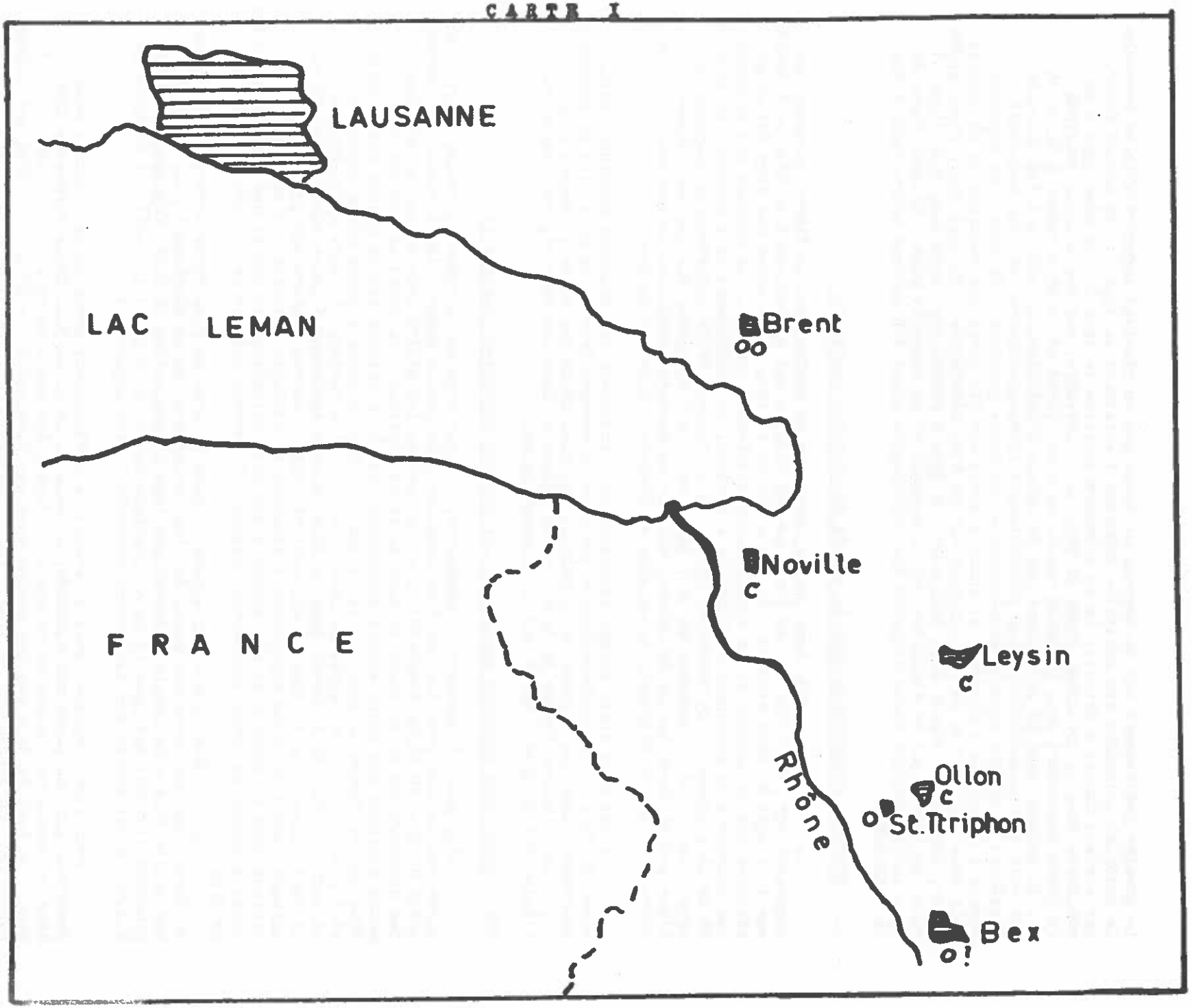
III. Apparition d'autres types dans les régions vaccinées (carte III)

Déjà dans l'observation précédente, l'apparition de la fièvre aphteuse vingt jours après vaccination peut inciter à se demander dans quelle mesure ledit vaccin est responsable du type du virus constaté. Avec la vaccination généralisée en partie trivalente les observations de ce genre se sont en effet répétées. En effet en bordure plus ou moins éloignée des zones encore contaminées et où la maladie est en déclin nous constatons quatre foyers de type A : le 15 janvier 1966 au Locle 6 jours après vaccination et à Courtaney 2 jours après celle-ci, le 17.1.66 à Cottens, 6 jours après vaccination. et enfin le 20.1.66 à Cornol dans le Jura bernois également 6 jours après vaccination. Il faut relever que le même vaccin employé dans d'autres régions sur près de 450 000 animaux jamais vaccinés auparavant a démontré sa parfaite inocuité. D'autre part, en liaison avec le premier de ces foyers à quelques kilomètres du Locle, des animaux vaccinés comme à Lausen 22 jours auparavant bivalent OC tombent malades le 20.1.66 le virus est de type C.

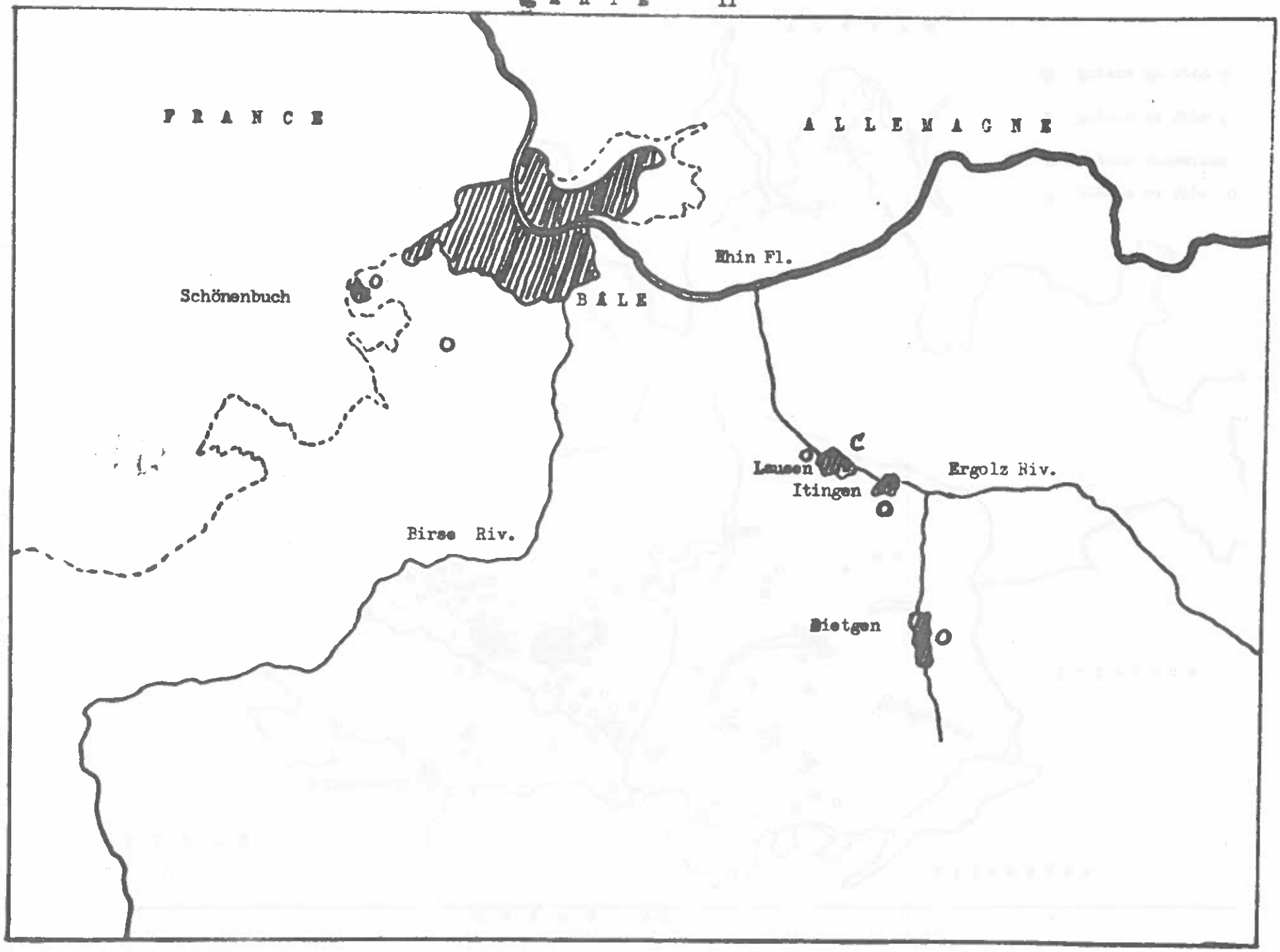
C'est le même type C qui apparaît, dans la zone de plus forte infection du canton de Berne, sur des porcs non vaccinés, les bovins traités ne réagissant pas, et forme une petite épizootie locale à Derendigen (une détermination 22.1.66) Koppigen (1 détermination 31.1.66) Aefligen (4 déterminations les 1, 2, 8.2. et 15.2.66) qui s'achève le 8.3.66, à Zollikofen sur des bovins vaccinés 5 mois auparavant.

Pour être complets, mais il s'agit là certainement d'une autre origine, nous observons sur des porcs non vaccinés, et cela du 20.3. au 5.4. trois foyers de type C dans le Tessin en liaison entre eux et 2 foyers également de type C le 25 avril 1966 à Mumpf, au bord du Rhin sur des bovins vaccinés bivalent OC le 22.12.65. Tous les autres foyers ont été causés par le même virus O, souche Brent, identique à la souche Autriche 65 et du groupe sous-type O_1 selon la nomenclature de Pirbright. Au total ce type a été retrouvé 452 fois, le type C 27 fois, le type A 4 fois, et 64 échantillons se sont démontrés indéterminables.

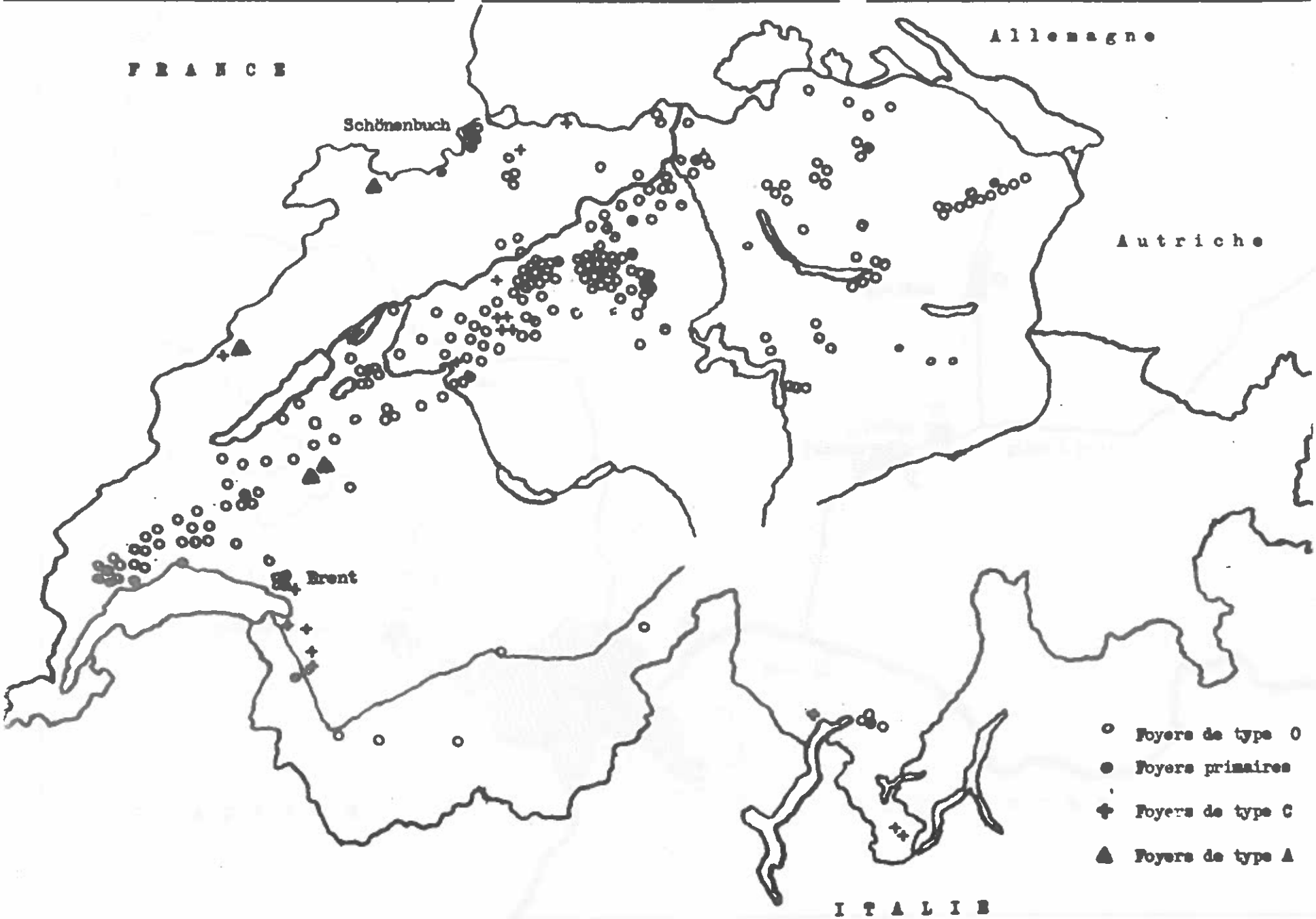
CARTE I


LAUSANNE
LAC LEMAN
Brent
Noville
FRANCE
Leysin
Rhône
Ollon
St.Triphon
Bex

CARTE II


FRANCE
ALLEMAGNE
Schönenbuch
BÂLE
Rhin Fl.
Lausen
Itingen
Ergolz Riv.
Birse Riv.
Bietgen

CARTE III


FRANCE
Allemagne
Autriche
ITALIE
Schönenbuch
Brent
Foyers de type O
Foyers primaires
Foyers de type C
Foyers de type A

IV. Discussion

Les faits étant résumés, essayons maintenant les diverses explications possibles pour voir en quoi elles leur sont contradictoires.

a) Les infections d'un autre type sont totalement indépendantes de l'épizootie en cours. Cette solution ne peut pas être écartée et elle est pour le moins très vraisemblable en ce qui concerne les derniers foyers du Tessin et de Mumpf. Elle est aussi possible dans les cas de Derendingen, Koppigen, Aefligen. Mais elle n'est plus que très difficilement admissible à Noville, Lausen et dans les quatre éclosions de type A, ce type n'étant pas apparu au nord des Alpes depuis plusieurs années.

b) La maladie est due au vaccin. Ce n'est certainement pas concevable à St. Triphon et Noville, les animaux n'ayant pas été vaccinés. C'est également peu compréhensible dans tous les foyers de type A qui ne sont que dans les zones marginales (on leur donnant à vrai dire une certaine largeur) alors que dans les régions plus éloignées le même vaccin est incontestablement inoffensif. Enfin tant à Lausen qu'au Locle, la maladie n'est apparue que 20 jours après la vaccination, c'est-à-dire après une période beaucoup trop longue d'après tout ce que l'on sait sur l'infectiosité éventuelle des vaccins à l'hydroxyde d'alumine.

c) La souche O de cette épizootie constitue une souche atypique au sens de Trautwein, ou une variante selon Heinig qui aurait tendance à prendre le caractère C au cours des passages. En fait nous devons constater que, partie du lac Léman, l'épizootie a progressé dans une zone relativement étroite, au sud du Jura et parallèlement à celui-ci, pour atteindre l'Allemagne et l'Autriche sans perdre notablement son caractère primitif. Cette hypothèse ne paraît donc pas vérifiée. Au surplus, la souche aurait dû posséder les trois types dont un seul serait responsable de pratiquement toutes les éclosions, les deux autres ne se manifestent que quatre fois chacun, sans extension marquée. Néanmoins dans le cas de Bex-St. Triphon-Noville il pourrait sembler que l'on retrouve sur le terrain le phénomène observé et décrit par Heinig. On pourrait admettre qu'à son début la souche aurait été complexe OC mais que les passages rapides, au lieu de faire sortir la composante secondaire l'aurait au contraire éliminée. Au laboratoire les deux souches Brent et Noville n'ont pas montré le moindre signe de variation dans 7 passages successifs. En tout état de cause, l'épizootie sur le plateau suisse est restée très homogène quant à son type jusqu'au mois de janvier 1966.

d) Les trois explications précédentes se heurtant à des invraisemblances et ne répondant pas à tous les faits observés, il faut bien en trouver une autre, ou bien admettre des causes multiples et inconnues, ou encore prendre note, hocher la tête avec un scepticisme résigné et espérer que l'avenir nous apportera ses lumières.

Relevons tout d'abord que, six à huit jours après vaccination, quel que soit le vaccin, suisse, italien ou français, un nombre notable de foyers est apparu dans des régions encore indemnes, mais certainement en contact même éloigné avec les zones contaminées. Le phénomène a été particulièrement remarqué dans les vallées qui paraissaient isolées par la neige dans les cantons du Valais, au sud, et de Schwyz et Glaris au centre de la Suisse. Il semble bien que là le virus O a été activé par la vaccination. Mais il s'agit d'un autre problème qui a déjà été présenté en son temps. En revanche tenant compte de cette période de sept jours environ, que nous retrouvons avec une régularité assez impressionnante, on est en droit de se demander si ledit virus n'était pas latent depuis un temps indéterminé. Or si l'on admet la possibilité d'une infection inapparente ou sans symptômes, mais avec présence permanente d'un virus non infectieux par lui-même (tel que van Bekkum l'a isolé de la salive d'animaux guéris), bien des choses pourraient s'éclaircir.

On sait depuis nos premières publications à ce sujet en 1947 confirmées par Girard, que dans le vaccin à l'hydroxyde d'alumine, le virus est inoffensif mais encore actif. Il ne s'agit pas d'une dénaturation partielle par le formol, mais d'un complexe dissociable. Il est inutile de revenir là-dessus qui est bien connu des spécialistes,

ce pourquoi d'ailleurs l'expression vaccin formulé est erronée et ne peut s'appliquer qu'au vaccin expérimental de Waldmann de 1937 qui n'a pas pu trouver d'application pratique parce qu'à la fois trop efficace et dangereux. Or on peut se demander si la vaccination ne serait pas précisément une infection inapparente, contrôlée et cliniquement inoffensive, et non pas une pure réaction immunologique à l'égard d'une molécule protéique étrangère. Que cette infection inapparente se combine avec une autre infection inapparente préexistante et il peut sembler vraisemblable que le type clinique qui en sortira pourra aussi bien être celui de l'une que de l'autre. L'apparition du type A dans les régions contaminées s'explique alors d'elle-même. Reste à voir si la chose est également possible pour les foyers de type C, sur les animaux vaccinés ou non. Et nous relevons dans la région figurant sur la carte I une série d'éclosions de ce type soit en février, avril, juin 1961 à Leysin, en juillet 1961 à Renaz près de Noville, en mai 1964 à Bex, en novembre 1964 de nouveau à Leysin, en décembre 1964 à Yvorne, le village voisin et enfin, en janvier 1965 à Vers l'Eglise à l'est de Leysin, sans qu'un rapport précis puisse être établi entre ces foyers assez éloignés les uns des autres dans le temps bien que groupés géographiquement.

Dans la région de Lausen, on relève également une épizootie limitée de type C, avec départ de Rheinfelden dans la basse vallée de l'Ergolz, en juillet-août 1964. Dans les deux cas, la possibilité d'une infection inapparente remontant assez loin en arrière, mais pas au point d'être totalement inadmissible ou invraisemblable est donnée.

Nous mettons l'hypothèse en discussion, soit pour provoquer des observations qui la confirment soit au contraire pour inciter à présenter des constatations qui l'infirment définitivement. Notre but a été surtout de présenter des faits qui demandent une explication plausible, beaucoup plus que d'en proposer une dont nous savons tout le caractère aléatoire.

ANNEXE 9

SOUS-TYPES DE VIRUS APHTEUX

SITUATION ACTUELLE

par

J. Davie *

On considère, à l'heure actuelle, que les différences dans les caractères antigéniques des souches de virus que nous qualifions de "sous-types" constituent des facteurs importants dans les problèmes liés à l'emploi du vaccin pour la prophylaxie de la fièvre aphteuse. Traub et Mohlam (1946) ont, les premiers, appelé l'attention sur la signification que pouvaient avoir les différences entre souches, mises en évidence par épreuves de fixation du complément à l'égard de l'efficacité de la protection conférée par des vaccins; de leur côté Galloway, Henderson et Brooksby (1948) ont pu montrer qu'il existait une bonne corrélation entre les résultats des épreuves de fixation du complément, des épreuves de séroneutralisation et des épreuves d'immunité croisée sur bovins vaccinés, lorsqu'ils comparèrent la souche du vaccin Pirbright A 119 (A12) avec des souches de virus isolées durant l'épidémie de fièvre aphteuse au Mexique. Des travaux ultérieurs effectués à Pirbright et dans d'autres laboratoires ont confirmé que les différences entre sous-types, mises en évidence par des techniques sérologiques, peuvent être mises en corrélation avec les résultats des épreuves de vaccination. Alors que la plupart des expériences relatives à la vaccination ont été limitées à l'épreuve hétérologue simple d'immunité vaccinale en utilisant des souches de virus du terrain, deux souches de virus de type SAT1 ont été comparées par épreuves de vaccination croisée sur bovins (Hislop, Davie et Carter, 1963); une expérience analogue est en cours pour comparer des souches de virus rapportées à la variante A22 Moyen-Orient (Tableau I).

Aux fins de commodité et d'économie, la comparaison des souches de virus est en premier lieu effectuée au moyen d'épreuves sérologiques mais nous devons toujours avoir en mémoire que la signification des résultats est liée à la protection croisée obtenue chez les bovins vaccinés lorsqu'ils sont soumis à l'épreuve hétérologue par inoculation d'une souche différente de virus. C'est pourquoi il est nécessaire d'établir des normes pour l'interprétation et la corrélation des résultats des épreuves de fixation du complément de séroneutralisation et de vaccination croisée. Lorsque ceci a été fait, nous pouvons avoir quelque confiance dans notre interprétation des résultats obtenus avec les tests utilisés pour les souches de virus isolées à partir des foyers de maladie.

Epreuve de fixation du complément

L'épreuve de fixation du complément utilisée est une modification (Davie 1964) de la technique mise au point et décrite par Brooksby (1952). Les sérums hyperimmuns sont préparés sur cobaye à partir des deux souches de virus à comparer. Les deux sérums sont alors titrés en présence des deux antigènes et les quantités de complément fixé par les combinaisons de virus et de sérum sont mesurées lorsque la proportion de ceux-ci est optimum pour obtenir une fixation maximum. Les quantités de complément fixé par les deux sérums dans leur réaction avec chacun des antigènes sont exprimées par la Relation de Fixation Croisée de la réaction hétéologue en tant que tantième de

---

* Animal Virus Research Institute, Pirbright, Surrey, Angleterre

la réaction homologue. Le produit des relations de fixation croisées exprime la relation antigène des deux souches de virus. Des souches de virus identiques ont un Produit de Fixation Croisée égal à 1, alors que des souches dissemblables ont des produits inférieurs à ce chiffre. Les souches de virus ayant des produits de fixation croisée égaux et supérieurs à 0,5, ont été groupées dans le même sous-type, bien qu'elles puissent présenter des différences antigéniques mineures.

Epreuves de séroneutralisation

Les épreuves de séroneutralisation sont effectuées sur plaques en utilisant la méthode d'inhibition du métabolisme décrite par Martin et Chapman (1961). Tous les sérums sont titrés dans des dilutions en série de raison 2, par rapport à 100TC/ID_{50} de virus et les titres sont exprimés par le log 10 de l'inverse de la dilution finale de sérum qui donne 50 pour cent de neutralisation du virus. Les différences antigéniques entre souches de virus d'épreuve homologue et hétérologue peuvent être exprimées par la différence entre les titres moyens de groupe des échantillons de sérum testés avec les deux souches de virus. Une différence du quadruple dans le titre est considérée comme exprimant une différence antigénique marquée entre les souches de virus d'épreuve.

Expériences de vaccination

Les bovins sont vaccinés à la fois avec des vaccins inactivés, type Frenkel et des vaccins vivants atténués, préparés par passage sur oeuf, souris ou culture de tissus. Les animaux sont éprouvés par inoculation intradermolinguale de 10^4ID_{50} de virus en dix points. Des vaccins inactivés ont été utilisés dans les épreuves d'immunité croisée, alors que l'on a fait appel à des vaccins atténués dans les épreuves de contrôle simple. Il est évident que l'interprétation des expériences de vaccination est beaucoup plus difficile. Il existe des variations considérables selon les vaccins, la race et l'âge des bovins et les conditions de conduite des expérimentations. Une comparaison exacte entre les vaccins ne pourrait être faite qu'en déterminant la dose protectrice 50 pour cent de chaque vaccin à l'égard d'épreuves homologue et hétérologue. Nous pouvons, cependant, comparer les titres d'anticorps homologues et hétérologues des sérums des bovins vaccinés. Nous utilisons, en effet, un test de séroneutralisation simple, pour déterminer l'aptitude du vaccin à élever le taux d'anticorps des animaux vaccinés au-dessus du taux de protection. Malgré leur coût élevé et les installations importantes qu'elles nécessitent, les expérimentations sur bovins sont nécessaires afin d'uniformiser nos techniques et d'établir une corrélation avec les épreuves sérologiques plus simples.

Le Laboratoire de référence mondial

Le Laboratoire de référence mondial est arrivé à la conclusion que les épreuves de fixation du complément et de séroneutralisation sont utiles pour déterminer la situation épidémiologique des foyers de la maladie et nous continuons à appliquer ces techniques aux quantités importantes d'échantillons prélevés lors de nos études sur le terrain. Dans la mesure du possible, cependant, nous en profitons pour recueillir des informations sur la vaccination et constituer des stocks de sérums de référence prélevés sur les bovins vaccinés et convalescents. Le Tableau II montre quelques-uns des résultats obtenus dans cette étude. Ces chiffres viennent à l'appui de l'utilisation des Produits de Fixation Croisée pour la comparaison des souches de virus inconnues et des souches standards, par exemple :

C.F.P.	1,0 > 0,5	Pas de différence antigénique marquée
	0,5 > 0,2	Légère différence antigénique
	0,2 > 0,05	Importante différence antigénique

Souches de virus de type O

Lors de l'épidémie due au virus SAT1 dans le Moyen-Orient en 1962, la présence concomitante de foyers de la maladie dus au virus de type O a compliqué les mesures prises pour enrayer l'extension du virus exotique. Les souches de virus de type O, prélevées en Israël, Syrie, Turquie, Grèce et U.R.S.S. ont été comparées entre elles et avec les souches de référence de sous-type connu ainsi qu'avec les souches de vaccin O Hollande et O Kemron, voisines de O_1 Lombardie. Ces souches de virus prélevées sur le terrain se sont révélées avoir une parenté plus étroite avec le sous-type O_1, qu'avec les autres sous-types. Les souches venant d'Israël et de Syrie étaient étroitement apparentées, de même que l'étaient celles de Turquie et d'U.R.S.S. Les souches d'U.R.S.S. et de Grèce étaient très voisines du O_1 Lombardie, alors que les souches de Turquie et d'Israël l'étaient moins. C'est pourquoi, nous nous sommes trouvés en présence d'un certain nombre de souches de virus ayant entre elles des relations étroites et s'apparentant au virus O_1 Lombardie à des degrés variables. Bien que nos connaissances sur les relations antigéniques des souches du sous-type connu et des souches de virus utilisées dans ces pays pour la production de vaccin soient limitées, les résultats des tests W.R.L., ont été confirmés par des informations relatives à l'efficacité ou la non efficacité de la protection vaccinale. Des vaccins homologues sont apparus très satisfaisants en Israël et en Turquie, alors qu'en Grèce, la valeur sur place d'une souche de vaccin d'origine hollandaise a été confirmée par les épreuves d'immunité croisée.

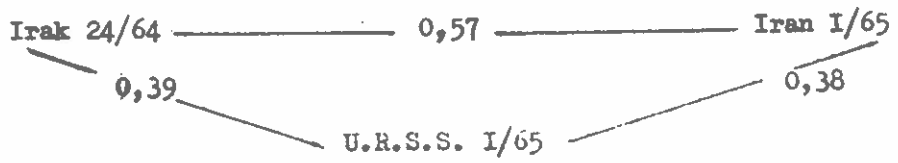
Nous avons par la suite examiné des souches de virus du type O venant de Hongrie, de Roumanie, d'Autriche, de Suisse et du Danemark. Ces souches ont une parenté étroite avec la souche Turquie 1669/63 ainsi qu'entre elles. La souche de virus de Roumanie a été examinée de façon approfondie par Muntiu et al. (1965) et on a observé une corrélation étroite entre les résultats des tests sérologiques et des tests d'immunité croisée sur bovins. Les souches de virus utilisées pour la production des vaccins dans les autres pays ne sont pas connues, mais il apparaît qu'en Allemagne une souche de vaccin O_1 venant d'Uruguay a donné de bons résultats.

Par conséquent, nous nous sommes trouvés en présence de foyers disséminés de maladie, causés par des souches de virus apparentées, mais non identiques. On rencontre une situation épidémiologique de ce genre dans les régions du monde où la fièvre aphteuse est relativement en sommeil, où la maladie se présente sous une forme atténuée et où les foyers ont peu de chance d'atteindre les proportions d'une épizootie, à moins que ne se développe ou ne soit introduit dans la région un nouveau type ou un nouveau sous-type de virus. Une telle maladie endémique peut habituellement être enrayée par l'emploi régulier d'un bon vaccin préparé à partir d'une souche d'un sous-type apparenté. Il est cependant essentiel que les souches de virus prélevées dans les foyers soient comparées périodiquement à la souche vaccinale pour s'assurer que la parenté entre les deux souches de virus reste relativement étroite.

Souches de virus de type A

Des souches de virus de sous-type A_{22} ont été isolées en Irak, en Israël, en Syrie, en Turquie et en Grèce; on n'a pas décelé dans ces souches de virus de variations antigéniques notables au cours de l'épidémie de 1965. Plus récemment, cependant, des souches de virus d'Iran et d'U.R.S.S. ont présenté une variation antigénique à l'intérieur du groupe du sous-type, par exemple:

C.F.P.



La portée de cette variation est en cours d'examen à Pirbright; une vaste expérimentation d'immunité croisée y est effectuée sur des bovins vaccinés et on espère que les résultats de cette expérimentation pourront être bientôt publiés. Nous croyons savoir qu'une expérimentation semblable est à l'heure actuelle effectuée en U.R.S.S.

Autres souches de virus

En Afrique, un nouveau sous-type du virus SAT3 a provoqué une épizootie chez des bovins vaccinés du Betchouanaland et un nouveau vaccin préparé à partir de la souche de virus homologue doit être prochainement éprouvé sur le terrain.

CONCLUSIONS

Ces observations mettent en valeur l'importance de la comparaison des souches de virus du terrain avec celles ordinairement utilisées pour la production de vaccin. Cette comparaison devrait être faite par l'épreuve croisée des deux souches de virus avec les sérums spécifiques de la souche, obtenus à partir d'animaux immunisés par infection avec les deux souches de virus. Les épreuves de fixation du complément sont faites avec les sérums spécifiques produits sur cobayes, mais, les épreuves de séro-neutralisation croisée effectuées avec des sérums de bovins convalescents, présentent également un grand intérêt pour effectuer cette comparaison. Idéalement, cependant, un certain nombre de bovins vaccinés et éprouvés par la souche de virus du terrain, dans des conditions expérimentales contrôlées, apportera la preuve de la valeur de tout vaccin utilisé pour enrayer un foyer de fièvre aphteuse.

BIBLIOGRAPHIE

1. BROOKSBY, J.B. (1952). A.R.C. Rept. Ser. , No 12.
2. BURROWS, R., GEERING, W.A., MOWAT, G.N. et SKINNER, H.H. (1963). Proc. 17th World Vet. Congr. Hannover, 499.
3. BURROWS, R. (1964). Non publié.
4. DAVIE, J. (1964). J. Hyg. Camb. , 62, 401.
5. GALLOWAY, I.A., HENDERSON, W.M. et BROOKSBY, J.B. (1948). Proc. Soc. Exp. Biol., 69, 77.
6. GALLOWAY, I.A. (1962). Bull. Off. int. Epiz., 57, 748.
7. HYSLOP, N.St.G., DAVIE, J. et CARTER, SALLY P., (1963). J. Hyg. Camb., 61, 217.
8. KANE, G.J. et PAY, T.W.F. (1964). Bull. Off. int. Epiz., 61, 713.
9. MARTIN, W.B. et CHAPMAN, W.G. (1961). Res. vet. Sci., 2, 53.
10. MARTIN, W.B., DAVIES, E.B. et SMITH, I.M. (1962). Res. vet. Sci., 3, 357.
11. MOWAT, G.N. et PRYDIE, J. (1962). Res. vet. Sci., 3, 368.
12. MOWAT, G.N. (1962). Non publié.
13. MONTIU, N. DOHOTARU, V., BERCAN, A. et TOMESCU, A. (1965). Bull. Off. int. Epiz, 63, 1627.
14. PAY, T.W.F. (1965). Non publié.
15. TRAUB, E. et MOHLAN, H. (1946). Berl. Munch. tierarztl. Wschr., 1, 1.

TABLEAU I

Type	Vaccin		V. d'épreuve		C F P	M.T.	% Protection		Remarques
	souche	sous-type	souche	sous-type		Hom-Het	Hom	Het	
A	A 119	A 12	MP	-	0,48	1,1	100	88	Galloway, Henderson & Brooksby (1948)
	MP	-	A 119	A_{12}		0,5	88	0	
	MP	-	M1	-	0,37	1,0	75	50	
	M1	-	MP	-		0,5	88	75	
SAT 1	RV 11/37	SAT 1/2	SA 13/61	SAT 1/5	0,2	0,69	100	60	Hyslop, Davie & Carter (1963)
	SA 13/61	SAT 1/5	RV 11/37	SAT 1/2		0,88	100	5	
A	Irak A 24/64	A_{22}	URSS 2/66	-	0,39	Expériences en cours			
	URSS 2/66	-	Irak 24/64	A_{22}					

TABLEAU II

Eléments sur la vaccination

Type	Vaccin Souche	Vaccin Sous-type	V. d'épreuve Souche	V. d'épreuve Sous-type	C F P	M T Hom - Het	% protection Hom - Het	Remarques
O	Kemron	O_1	Isr. 1/63	-	0,28	0,64	- 43	Kane & Pay (1964)
A	A-119	A_{12}	Thai 1/60	A_{15}	0,04	0,43	- 13	Sur Zebu. Burrows, Geering, Mowat
							- 80	Sur Buffle & Skinner (1963).
	Kemron	-	A. Pando	A_5	0,1	0,97	100 80	Burrows, Geering, Mowat & Skinner (1963).
	Kemron	-	Irak 24/64	A_{22}	0,034	1,60	- 20	
SAT1	RV11/37	SAT 1/2	SA 13/61	SAT 1/5	0,2	0,48	100 50)	Burrows, Geering, Mowat,
	RV11/37	SAT 1/2	SWA 4/62	SAT 1/6	0,1	0,52	100 60)	Skinner (1963).
	RV11/37	SAT 1/2	Tur 323/62	SAT 1/7	0,01	-	100 5	Mowat (1962).
	Tur43/62	SAT 1/7	Tur 323/62	SAT 1/7	0,7	-	- 81	Pay (1965).
	Tur43/62	SAT 1/7	Sud 2/61	SAT 1/7	0,8	$\leqslant$ 0,0	- 70	"
	Isr.4/62	SAT 1/7	Tur 323/62	SAT 1/7	0,53	-	- 81	"
	Isr.4/62	SAT 1/7	Sud 2/61	SAT 1/7	1,0	$\leqslant$ 0,0	- 80	"
SAT2	Rho.1/48	SAT 2/1	SA 106/59	SAT 2/2	0,2	-	- 70	3 000 bovins en SA. Galloway (1962)
							100 63	à Pirbright. Martin, Davies & Smith (1962).
	Rho.1/48	SAT 2/1	Ken 11/60	SAT 2/3	0,13	-	- 64	Zebu) Mowat & Prydie
							27	Catégories) (1962).
SAT3	SA 57/59	SAT 3/2	Bec 3/64	-	0,14	0,88	- 75	Double vaccination. Burrows (1964)
ASIA 1	Pak 1/54	Asia 1/1	Isr. 3/63	Asia 1/2	0,21	-	- 0	Pay (1965)
	Kemron BHK	-	Isr. 3/63	Asia 1/2	0,22	0,41	- 30	
	Kemron mouse	-	Isr. 3/63	Asia 1/2	0,22	0,21	- 0	

ANNEXE 10

VARIANTES IMMUNOLOGIQUES DU VIRUS APHTEUX

par

F. Lucam, M. Fedida, G. Dannacher, J. Perraud *

D'un point de vue immunologique, la notion de "variante" ou "sous-type" du virus aphteux ne peut être dégagée qu'à partir de la notion préliminaire de "type", l'une et l'autre reposant exclusivement sur un rapport entre des grandeurs d'immunité.

La notion de type doit avoir, en principe, un caractère absolu. Deux souches seront dites de type différent lorsque des bovins, immunisés contre l'une, de telle manière que leur immunité soit totale, ont, contre l'autre une immunité nulle et inversement. Notons que cette définition ne modifie en rien quant au fond celle de H. Vallée, pour qui les types de virus aphteux se distinguent entre eux, parce que leur valeur immunisante est "strictement monovalente". (5).

La notion de "variante" ou "sous-type" ne doit avoir en principe qu'un caractère relatif. De deux souches de même type, l'une sera dite variante de l'autre, lorsque des bovins immunisés contre la première, quelle que soit la valeur de leur immunité, ont, contre la seconde, une immunité moindre et sans que l'inverse soit toujours vrai. Là encore nous ne faisons que préciser ce qu'écrivait H. Vallée (5) au sujet "des formes hétérotypiques" du virus aphteux, étudiés par Waldmann et Trautwein, et "dont les inoculations croisées ne donnent plus des résultats univoques".

En théorie, cette manière d'exprimer la notion de variante est suffisante. Pour la rendre plus directement accessible, il suffira d'établir, par une méthode quantitative, le rapport entre les deux grandeurs d'immunité. C'est ce que font, d'une part Muntiu et coll (4) à l'aide de la méthode "du produit des immunités croisées", appliquée au boeuf et d'une part, J. Fontaine et coll (2) par la détermination de la "dose vaccinale 50%, croisée sur cobaye".

En pratique, elle doit cependant être complétée sous peine de manquer l'utilité. Quel intérêt y a-t-il, en effet, à savoir que, de deux souches S1 et S2, la souche S2 est une variante de S1? C'est avant tout de savoir si les vaccins qui sont préparés avec la seule souche S1 et utilisés après contrôle officiel dans les campagnes de vaccination, confèrent une immunité suffisante ou non contre la souche S2 au cas où cette dernière menacerait notre cheptel.

Or, parmi tous les lots de vaccins préparés avec S1, une longue expérience des contrôles nous permet d'affirmer que, si certains possèdent une très haute activité contre cette souche, au point de pouvoir la considérer comme "totale", d'autres ont une activité égale ou peu supérieure à l'actitité minimale requise. Pour les premiers, l'activité contre S2 sera moindre certes, mais pourra être encore parfaitement suffisante. Pour les seconds, il est évident qu'elle ne le sera plus. Pour les premiers, le fait que S2 soit une variante de S1 n'aurait alors aucune importance, pour les seconds, il serait lourd de conséquences.

Si donc nous voulons que la notion de variante soit utile, il est absolument nécessaire qu'elle soit établie, non pas à un niveau quelconque d'état immunitaire post-vaccinal, mais à celui qui correspond à l'efficacité minimale requise pour les vaccins antiaphteux. Or cette dernière, assurée par l'indice de protection K, ayant été fixée à log K = 1,2, pour les vaccins "acceptés - classe I" au contrôle officiel (1), nous dirons : "de deux souches S1 et S2 de virus aphteux, appartenant à un même

---

* Laboratoire de virologie animale, Lyon, France

type donné, la souche S2 est une variante de la souche S1 si, la grandeur de l'état immunitaire provoqué chez le boeuf, au moyen d'un vaccin quelconque préparé avant au type donné, avec la seule souche S1, étant de log K 1,2, contre cette souche est inférieur à cette valeur contre S2.

La méthode que nous employons pour savoir si la souche S2 est une variante de la souche S1 est celle dite de "L'essai en six points". (3)

Elle consiste à comparer les deux lignes de régression "effet sur log. dose", c'est-à-dire ici, "état immunitaire sur log. de la dose vaccinale", obtenue l'une avec S1 l'autre avec S2.

Pour effectuer cette comparaison, nous constituons 6 groupes de 4 bovins que nous indiquons A. B. C. A'. B'. C'.

A l'aide d'un vaccin quelconque, dans lequel n'entre, pour le type de virus considéré, que la souche S1, nous vaccinons les groupes A. et A', puis B. et B', puis C et C', avec des doses de vaccin échelonnées en progression géométrique. Ces doses sont établies de manière à ce que les états immunitaires attendus contre la souche S1, encadrent la valeur de référence log K = 1,2.

Trois semaines plus tard, on mesure l'Indice de protection K sur les groupes A. B. C. avec S1 et sur les groupes A'. B'. C'. avec S2.

La comparaison des deux séries de valeurs de K montrera si celle qui correspond à S2 se situe à un niveau inférieur à celle qui correspond à S1 et, dans ce cas, si la différence observée est significative.

La méthode est appliquée avec les souches O Flandre (Willems 1947) et O Lausanne (Moosbrugger 1965) pour les raisons suivantes.

A la fin de l'année 1965, un certain nombre de foyers de fièvre aphteuse apparaissent en Suisse, sur des bovins, à partir desquels, plusieurs souches de virus sont isolées qui se révèlent être du type O. L'une d'elles, étiquetée "O Lausanne 1965", nous est transmise par le Docteur MOOSBRUGGER.

A cette époque, la France est indemne. Quant aux vaccins utilisés dans la prophylaxie générale, ils sont préparés et contrôlés officiellement pour le type O, avec une souche étiquetée "O Flandre" (Willems) - souche bovine isolée le 19.11.47 par le Docteur Willems. Ajoutons que, selon les laboratoires producteurs, cette souche est utilisée, dans la préparation des vaccins seuls ou en association avec d'autres de même type.

Dans l'éventualité d'une extension des foyers Suisse, et en conséquence, d'une menace pour notre pays, il devenait important de savoir si les vaccins français, préparés avec la seule souche O Flandre, pourraient, dans tous les cas, conférer une immunité suffisante contre la souche O Lausanne, en d'autres termes si O Lausanne était une variante de O Flandre.

A l'aide d'un vaccin trivalent, puis au hasard dans la série des productions industrielles, reconnu comme "accepté-classe I" au contrôle officiel (1) et dans la valence O duquel n'entre que la souche O Flandre, nous préparons l'essai en six points comme il vient d'être dit, les doses vaccinales utilisées étant : dose entière ; 1/4 de dose; 1/16 de dose.

Les résultats de cet essai sont représentés dans la figure I, ou sont portés en abscisse les log. des doses vaccinales et en ordonnée les log. K de chacun des groupes de 4 bovins.

Figure I

F ⟶ F = états immunitaires, exprimés en log. K, des animaux vaccinés avec le vaccin O Flandre et éprouvés avec la souche O Flandre.

F ⟶ L = états immunitaires, exprimés en log. K, des animaux vaccinés avec le vaccin O Flandre et éprouvés avec la souche O Lausanne.

La figure I montre que l'essai est interprétable, au sens que nous donnons à la notion de variante, puisque les états immunitaires des animaux vaccinés avec le vaccin O Flandre et éprouvés avec la souche O Flandre, encadrent bien la valeur log. K = 1,2 que nous avons choisie comme référence.

En outre, l'étude statistique des résultats, effectuée par la méthode de l'analyse de variance appliquée à l'essai en six points, à l'aide des valeurs de log. K de chaque animal, montre que :

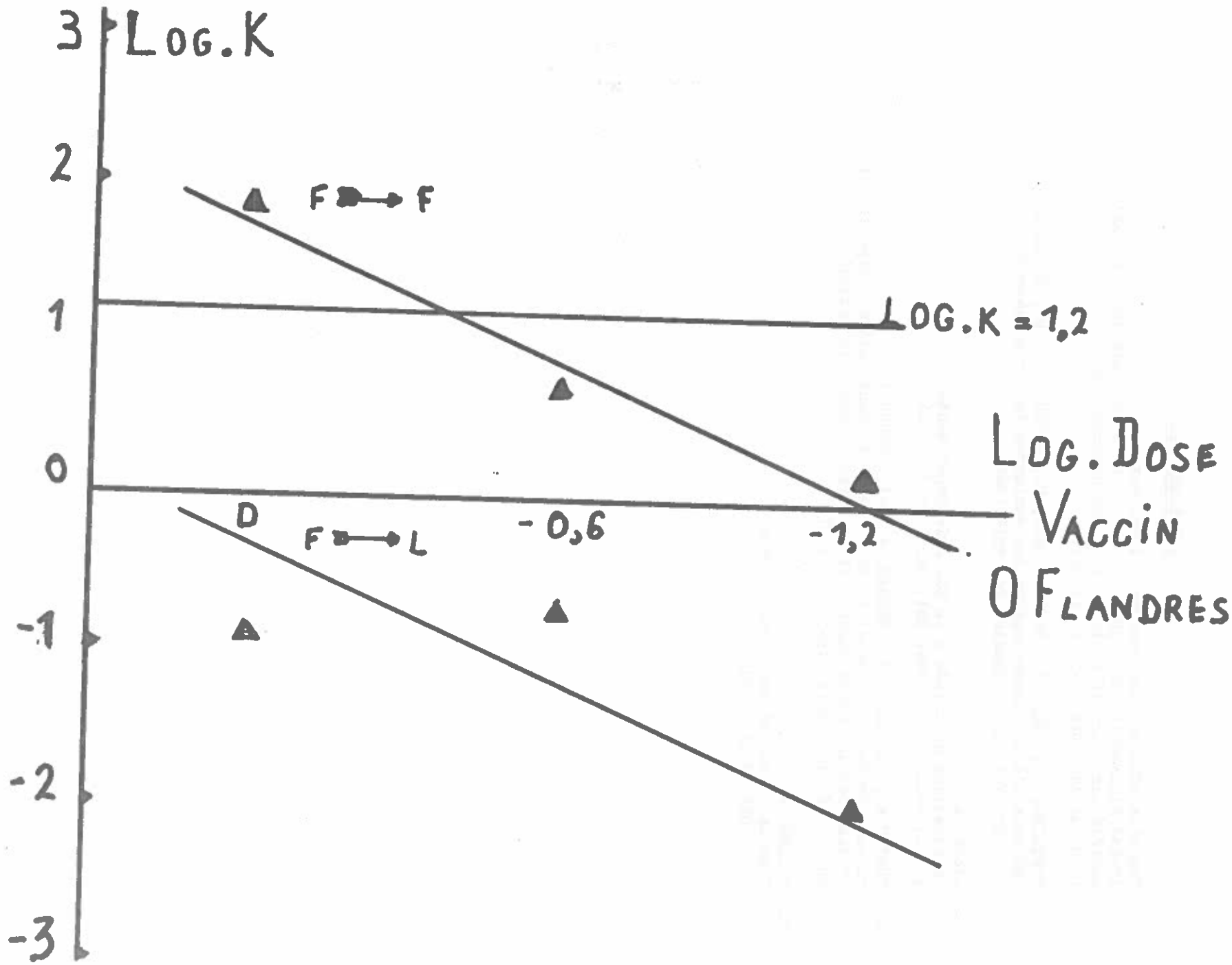
1. lorsque les états immunitaires, obtenus contre O Flandre ont pour valeur log K = 1,2, ils ont une valeur inférieure contre O Lausanne;

2. la différence entre ces deux valeurs, qui est égale à 2,2 log. K, est hautement significative;

3. la vraie valeur de cette différence est comprise, pour une probabilité de 95%, entre log. K = 3,37 et log. K = 1,03.

Nous pouvons donc conclure que la souche O Lausanne est une variante de la souche O Flandre.

La conséquence pratique de cette constatation est qu'un certain nombre de vaccins, préparés avec la seule souche O Flandre et dont l'activité contre cette souche est égale ou peu supérieure à l'activité minimale requise, ne donneront qu'une protection nettement insuffisante contre la souche O.


LOG.K
3
2
1
0
-1
-2
-3
F → F
LOG.K = 1,2
LOG.DOSE
VACCIN
OFLANDRES
D
F → L
- 0,6
- 1,2

BIBLIOGRAPHIE

1. Contrôle officiel des vaccins antiaphteux.
Arrêté Ministériel du 8 juin 1965 (J.O. 28 et 29 juin 1965, p. 5401)
modifié par l'arrêté Ministériel du 24 décembre 1965.
(J.O. 31 décembre 1965, p. 12003).

2. FONTAINE, J., TERRE J., ROUMIANTZEFF, M., DUBOUCLARD, D., BORNAREL, P., et FAVRE, H.
"Méthode d'étude immunologique des variantes de virus aphteux".
Soc. Sc. Vet. Lyon, Réunion 24 avril 1966.

3. LISON, L.
"Statistique appliquée à la Biologie Expérimentale"
1 vol. Gauthier Villers, Edt. Paris 1958, p. 260.

4. MUNTIU N., DOHOTARU, V., BERCAN, A., et TOMESCU A.
"Cross. Protection Product in an Attempt of Quantitative Antigenic Differentiation of the Foot-and-Mouth Disease Virus Strains Type O in Cattle".
Bull. Off. Int. Epiz. 1965, 63, 1627.

5. VALLEE, H.
"Sur la pluralité des virus aphteux".
Bull. Off. Epiz. 1928, 1, 500.

ANNEXE 11

ETUDES SUR LE TERRAIN DE LA FIEVRE APHTEUSE AU BETCHOUANALAND

par R.S. Hedger *

La vie économique du Betchouanaland repose presque entièrement sur l'exportation de la viande bovine et du bétail de boucherie vers les autres pays. C'est pourquoi la fièvre aphteuse (FMD) revêt une importance considérable, elle constitue un facteur influant sur le déplacement du bétail à partir des zones dans lesquelles on admet que la maladie existe à l'état enzootique, pose le problème de la garantie de l'innocuité des viandes exportées. Un contrôle très strict a été exercé pendant de nombreuses années pour éviter l'exportation des viandes et du bétail à partir des zones dangereuses, car, malgré l'état sous-développé du pays, son éloignement et l'insuffisance des voies de communication, les autorités vétérinaires locales connaissent très bien l'historique de la fièvre aphteuse dans le territoire. Depuis 1948, tous les foyers de la maladie observés ont fait l'objet de typages effectués à Pirbright. Jusqu'à maintenant deux types seulement, SAT 1 et SAT 3 ont été signalés dans le pays. On a ainsi considéré que le Betchouanaland convenait éminemment pour mener une vaste étude sur le terrain et, à la fin de 1964, on a effectué, dans le territoire, un contrôle de l'état d'immunité du cheptel domestique de différentes zones.

Zone d'action

Les deux premières localités (zone 1 et zone 2) choisies pour cette étude étaient situées sur la rivière Botletle, dans le nord du territoire. Le Botletle qui coule dans la partie méridionale du Ngamiland et dans la partie occidentale de la région de la tribu de Bamangwato, forme une des frontières septentrionales du désert de Kalahari. Hormis quelques puits épars, cette rivière est la seule source d'eau permanente sur des centaines de milles. Le Botletle est donc une région clé en ce qui concerne la fièvre aphteuse, non seulement à cause des déplacements constants de bétail et de gibier qui vont s'y abreuver, mais aussi parce que tout le bétail sortant du Ngamiland où la fièvre aphteuse a longtemps été considérée comme existant à l'état enzootique, doit traverser cette région.

La troisième localité choisie (zone 3) se trouvait dans la partie orientale du territoire, près de Serowe, à une distance considérable des régions d'enzootie aphteuse.

Les données les plus récentes sur la situation aphteuse dans ces zones sont les suivantes :

Zone 1 (Botletle)

Septembre 1961 : Foyers de types SAT1 et SAT3 dans la zone.

Septembre 1963 : Foyers de type SAT3 suivis par l'aphtisation de tous les bovins et de toutes les chèvres infectés.

Mars 1964 : Vaccination des bovins avec le vaccin inactivé, type SAT3 (souche SA. 57/59) de Pirbright [1].

Zone 2 Botletle)

Septembre 1961 : Foyers des types SAT1 et SAT3 dans la zone.

Mars 1964 : Vaccination des bovins aveo du vaccin inactivé, type SAT3 (SA. 57/59) de Pirbright.

---

* The Animal Virus Research Institute, Pirbright, Surrey, Angleterre

Zone 3 (Serowe)

1961 : Foyers de fièvre aphteuse apparus dans la zone, très probablement de type SAT_1, mais non confirmé. Il n'y a pas eu de foyers depuis lors.

MATERIEL ET METHODES UTILISES

Les essais antérieurs effectués pour étudier l'état d'immunité dans des régions déterminées d'Afrique, ont montré qu'il est difficile d'arriver à une évaluation de l'immunité du cheptel par des prélèvements de sang effectués au hasard et par la mesure du taux des anticorps. On trouve parfois des titres élevés, mais la majorité des animaux peuvent ne présenter que peu ou pas d'anticorps. Burrows[2] a attiré l'attention sur le fait suivant : l'apparition après revaccination d'une réponse immunitaire secondaire distincte de la réponse primaire habituelle permet de détecter les animaux qui ont déjà été sensibilisés par une dose d'antigène viral. On a considéré qu'on pouvait avoir, de la sorte, des renseignements sur l'état du bétail des régions d'enzootie, de façon plus effective qu'en procédant à des prélèvements sur des animaux isolés. On s'est rendu compte que la différenciation entre réponse immunitaire * primaire et secondaire, serait parfois arbitraire dans le cas d'animaux particuliers, mais en l'occurence, on a jugé qu'il était possible de décider si la réponse d'un groupe pris dans son ensemble était primaire ou secondaire, en se basant sur le changement du titre moyen d'anticorps du groupe. Les lectures ont été effectuées aux 7ème et 21ème jours seulement, et si au 7ème jour, le titre s'était multiplié par dix ou plus, par rapport au titre initial, que, d'autre part, aucune augmentation supérieure à deux ou quatre fois, au bout de 21 jours n'était constatée, ce groupe était considéré comme ayant une réponse secondaire. Dans le cas d'élévation non marquée, au bout de 7 jours, mais apparaissant à 21 jours, on considérerait qu'il s'agissait d'une réponse primaire. La confirmation du type de réponse secondaire attendue a été apportée par les animaux qui, ayant un taux initial d'anticorps faible, ont vu celui-ci augmenter dans de grandes proportions, huit à dix fois, au cours des sept premiers jours; comme on s'y attendait, on a vu des animaux sans anticorps initiaux, réagir des deux façons, les uns avec réponse secondaire et les autres réponse primaire. Dans un petit nombre de cas, on a trouvé certains animaux qui, ayant un taux d'anticorps initiaux marqué, n'ont pas présenté l'élévation attendue du taux de ceux-ci, à la suite de l'incitation secondaire.

Dans chacune des zones 1 et 2, trois groupes de 50 bovins indigènes et trois groupes de 20 chèvres indigènes, ont été choisis au hasard, marqués, et ont fait l'objet d'un examen clinique pour rechercher les maladies intercurrentes. Le premier groupe de 50 bovins et 20 chèvres de chaque zone a été vacciné par la voie sous-cutanée avec du vaccin 1 SAT_3 (SA. 57/59) inactivé par le formol, le second groupe avec un vaccin similaire SAT_1 (SWA 40/61) et les animaux du troisième groupe ont été laissés comme témoins.

Les sérums ont été prélevés aux jours 0,7 et 21 et, examinés, du point de vue des anticorps neutralisants par le test d'inhibition du métabolisme cellulaire (Colourtest)[3], en utilisant des couches monocellulaires primaires de cellules de reins de porcs. Dans tous les tests, ont été utilisées des souches de virus adaptées en culture de tissus, homologues des souches de virus du vaccin respectif. Les dilutions critiques 50 pour cent ont été estimées selon la méthode de Kärber et les titres de neutralisation sont exprimés par la dilution finale de sérum présent dans le mélange sérum-virus à la dilution critique 50 pour cent.

Au cours de cette étude, la formation nette d'anticorps hétérotypiques a été observée tant sur les bovins que sur les chèvres.

---

* Note du traducteur : le mot "réponse" traduction littérale du terme anglais "response" signifie en réalité formation d'anticorps.

RESULTATS

1. Bovins

La Fig. 1 montre les moyennes géométriques des titres d'anticorps seriques pour chaque groupe de bovins examinés respectivement à l'égard des virus SAT_3 (souche SA 57/59) et SAT_1 (souche SWA 40/61). Les courbes des groupes témoins qui n'ont pas présenté de variations marquées entre les moyennes aux jours 0,7 et 21, ont été exclues pour plus de clarté.

Les courbes illustrent graphiquement les taux d'immunité, vis-à-vis de chaque type de virus existant au jour 0, ainsi que la nature et l'intensité des réactions aux incitations secondaires.

Dans la Fig. 2, les résultats concernant les différents animaux présentés dans les graphiques en tant que moyenne de groupe de la Fig. 1, sont analysés sur la base du pourcentage des différents animaux de chaque zone, donnant des réponses secondaires et hétérotypiques. Si un animal présentait, soit une réponse secondaire, soit une réponse hétérotypique, soit les deux, ou encore un titre important au jour 0, il était considéré comme ayant déjà été en contact avec le type de virus vis-à-vis duquel il répondait ; et le pourcentage d'animaux ayant été antérieurement contaminés dans chaque groupe est également mentionné.

Dans la zone 1, où existait une sensibilisation relativement récente des bovins et des chèvres au virus SAT_3, du fait de l'infection et de la vaccination, on a trouvé des taux moyens d'anticorps existant SAT_3 très élevés. Comme on s'y attendait, une proportion élevée d'animaux a présenté une réponse secondaire. L'observation la plus intéressante a été celle de la réponse hétérotypique marquée à la vaccination SAT_1. Les titres d'anticorps SAT_3 ont tous atteint des taux élevés.

Un certain nombre d'animaux de cette zone avait un titre sérologique SAT_1 élevé au jour 0 et 58 pour cent des bovins vaccinés avec le vaccin SAT_1 ont manifesté une réponse secondaire. Ceci a été surprenant du fait qu'il n'y a pas eu dans le pays d'infection ou de vaccination SAT_1 depuis trois à quatre ans. Quatre animaux seulement ont réagi de façon hétérotypique à la vaccination SAT_1.

Dans la zone 2, comme on pouvait s'y attendre, étant donné qu'il n'y avait pas eu de foyers récents et que la vaccination seulement y avait été effectuée presqu'un an auparavant, les taux d'anticorps initiaux décelés étaient bas. La vaccination SAT_3 a provoqué une réponse secondaire nette sur l'ensemble du troupeau ; le vaccin SAT_1 qui n'a pas entraîné une immunité homologue satisfaisante du troupeau, a, en fait, immunisé convenablement celui-ci contre SAT_3, probablement parce que les animaux avaient été sensibilisés à la suite de la vaccination antérieurement effectuée avec SAT_3.

Le vaccin SAT_3 a provoqué une réponse hétérotypique SAT_1 chez 20 pour cent des bovins seulement de ce groupe. Ces réponses ont généralement été moins importantes que les réponses hétérotypiques SAT_3.

Dans la zone 3, quelques animaux ont montré les signes d'une contamination antérieure par le virus SAT_3 et la réponse à la vaccination SAT_3 a été faible.

Une proportion élevée des animaux de cette zone a présenté des réponses secondaires, des réponses hétérotypiques ou des taux d'anticorps initiaux démontrant qu'ils avaient antérieurement été contaminés par le virus SAT_1. On peut raisonnablement supposer que le type de virus en cause dans le dernier foyer a été, en fait, SAT_1 et qu'il n'y avait pas eu d'infection SAT_3 dans la région depuis une période de temps assez longue.

2. Chèvres

La figure 3 illustre les résultats enregistrés chez les chèvres des deux premières zones. Les sérums des chèvres de la troisième zone n'ont pu être obtenus. En général, ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus avec les bovins, mais avec moins de netteté. Les réponses hétérotypiques et secondaires, ont été nettes vis-à-vis des deux types de virus dans la zone 1, mais dans la zone 2 où les chèvres n'avaient été infectées ni naturellement, ni par aphtisation ni vaccinées avec SAT_3 en 1963/64, on n'a pas enregistré de réponses hétérotypiques SAT_3 à la vaccination SAT_1, et un seul animal a manifesté une réponse secondaire à la vaccination SAT_3; ceci indique, qu'il n'y avait pas eu d'infection récente SAT_3 des chèvres dans la région, et que la sensibilisation SAT_3 du bétail de la zone avait probablement été entièrement provoquée par la vaccination effectuée en 1964. Il y a eu cependant quelques réponses secondaires et hétérotypiques au virus SAT_1 sur les chèvres des deux zones.

DISCUSSION

La fréquence des réponses secondaires chez ces animaux ayant des titres sérologiques au jour 0 faibles ou indécelables a illustré la valeur de l'emploi du vaccin sur des groupes d'essai d'une population animale en tant que méthode d'évaluation de son état d'immunité qui peut ne pas apparaître nettement avec les seuls prélèvements de sang faits au hasard. Dans la zone 2, par exemple, 73 pour cent des bovins soumis aux épreuves n'ont pas révélé de taux d'anticorps marqués en ce qui concerne le virus SAT_3 au jour initial. Les prélèvements de sang consécutifs à l'emploi du vaccin ont cependant révélé que 77 pour cent des animaux avaient en fait été antérieurement sensibilisés au virus.

Les réponses hétérotypiques SAT_3 à la vaccination SAT_1 dans les deux zones qui avaient été sensibilisées au virus SAT_3 à une époque relativement récente du fait, soit de la vaccination, soit de l'infection, ont été frappantes et plus marquées dans la zone où le degré de sensibilisation avait été plus grand. Dans la troisième zone où il n'y avait pas eu au préalable de sensibilisation générale par le virus SAT_3, 4 animaux seulement ont présenté des réponses hétérotypiques. On pense que la présence de ces 4 animaux dans le troupeau peut s'expliquer par le trafic normal d'animaux lié au commerce et à d'autres facteurs.

Des réponses hétérotypiques SAT_1 à la vaccination SAT_3 se sont produites sur des animaux isolés des trois zones, mais beaucoup d'animaux qui ont révélé leur contamination antérieure par le virus SAT_1 du fait de leur taux d'anticorps élevé au jour 0, n'ont pas présenté de réponse. Les résultats suggèrent que la réaction hétérotypique peut ne pas se produire avec toutes les souches de virus.

L'utilisation des vaccins sur des groupes d'essai apparaît d'une valeur particulière dans l'évaluation des résultats probables de la vaccination préventive de populations entières dans différentes régions écologiques.

Les vaccins qui se sont révélés efficaces en Europe pour le bétail européen ne peuvent pas toujours provoquer les résultats espérés sur le bétail africain soumis à des conditions différentes. On peut cependant conserver quelques doutes quant au crédit que l'on peut attribuer à la seule réponse immunitaire primaire dans ces régions, et la répétition de la vaccination peut être à conseiller dans les zones où le bétail n'a pas été préalablement sensibilisé au virus.

BIBLIOGRAPHIE

1. - Morrow, A.W., Hyslop, N. St G. et Buckley, L.S. (1966), Vet, Rec., 78, 2.

2. - Burrows, R. Geering, W.A., Mowat, G.N. et Skinner, H.H. (1963) Proc. XVII Int. vet. Congress, Hanover, Vol. 1. 499.

3. - Martin, W.B. et Chapman, W.G. (1961) Res. vet. sci., 2, 53

4. - Kärber, G. (-1931). Arch. exp. Path. Pharmak, 162, 480.

Fig. 1

B O V I N S

Zone 1

Vaccin SAT 3 aux jours 0 **Vaccin SAT 1 aux jours 0**

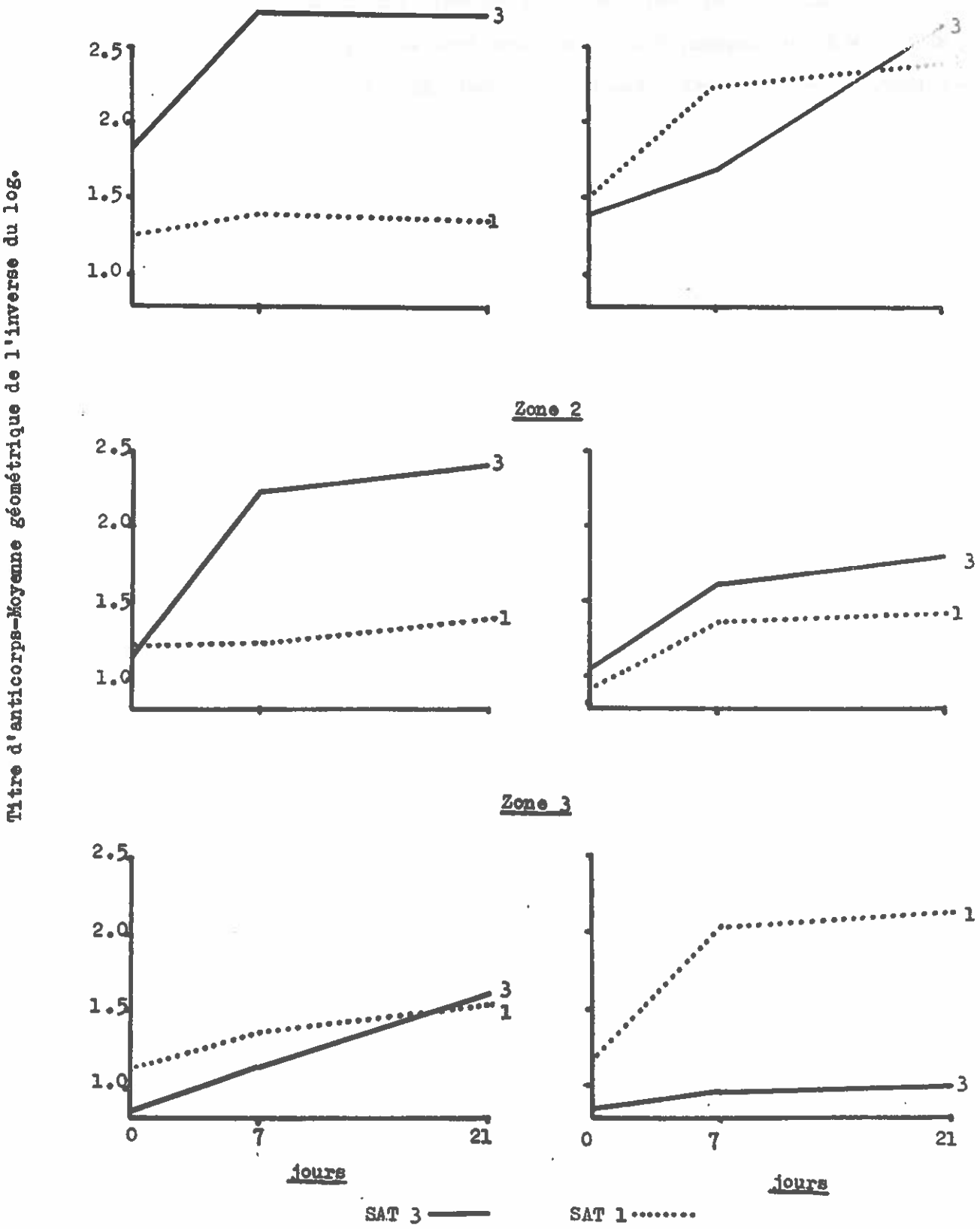


Fig. 2

Bovins

Zone 1

	SAT 3	SAT 1
Réponses secondaires	70 %	58 %
Réponses hétérotypiques	100 %	9 %
Contamination antérieure	100 %	63 %

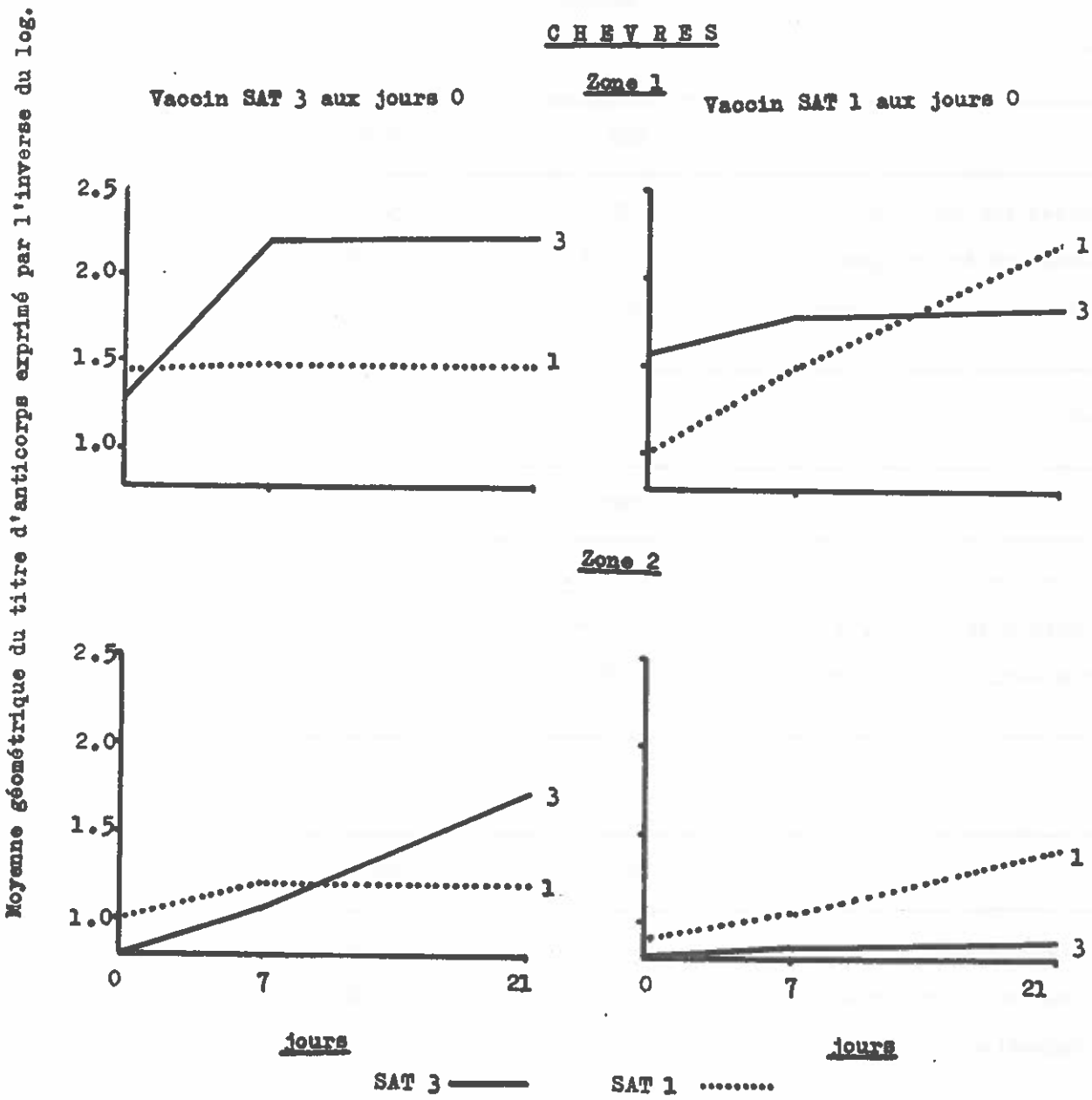
Zone 2

	SAT 3	SAT 1
Réponses secondaires	67 %	25 %
Réponses hétérotypiques	75 %	20 %
Contamination antérieure	77 %	42 %

Zone 3

	SAT 3	SAT 1
Réponses secondaires	6 %	55 %
Réponses hétérotypiques	15 %	57 %
Contamination antérieure	10 %	58 %

Fig. 3


CHEVRES
Zone 1
Vaccin SAT 3 aux jours 0
Vaccin SAT 1 aux jours 0
Zone 2
Moyenne géométrique du titre d'anticorps exprimé par l'inverse du log.
2.5
2.0
1.5
1.0
3
1
0
7
21
jours
SAT 3
SAT 1

ANNEXE 12

OBSERVATIONS SUR L'ETAT DE PORTEUR DE VIRUS APRES CONTACT AVEC LE VIRUS APHTEUX

par

R. Burrows *

I. BOVINS EN CONTACT AVEC DU VIRUS ACTIF

La persistance du virus de la fièvre aphteuse dans la région oesophagienne et pharyngée de certains bovins pendant une durée pouvant atteindre 6 mois après la maladie ou l'exposition de l'animal à l'infection, a été étudiée par Van Bekkum, Frenkel, Frederiks et Frenkel (1959) Sutmöller et Gaggero (1965) ainsi que Burrows (1966). La durée de cet état de porteur de virus n'a cependant pas été complètement recherchée. Van Bekkum et al ont découvert que la proportion de bovins porteurs de virus diminuait avec le temps et que la plupart d'entre eux devenaient négatifs dans les 4 à 5 mois. Sutmöller et Gaggero ont retrouvé le virus sur environ 50% des animaux examinés 4 et 6 mois après une épizootie de fièvre aphteuse, leurs résultats étant compliqués par la découverte dans chaque cas de deux types immunologiques de virus.

Nous avons maintenant suivi l'état de porteur de virus dans des groupes de bovins, pendant des périodes allant jusqu'à 16 mois après infection. Le présent rapport indique les résultats de ce travail, ainsi que les études allant de pair sur la caractérisation du virus retrouvé chez les animaux porteurs, à diverses périodes.

Durée de l'état de porteur de virus

Le tableau 1 indique les souches de virus utilisées, le nombre de bovins en cause, ainsi que la périodicité des prélèvements. Tous les animaux avaient été infectés par inoculation intradermolinguale et chez tous, à l'exception d'un, la maladie s'était développée sous une forme grave et généralisée. La durée pendant laquelle le virus a pu être isolé à partir de chaque animal est représentée sous forme de diagramme sur la figure 1. Bien que le nombre d'animaux de chaque groupe soit réduit et que, dans certains cas, on ne soit pas arrivé aux points limites, il apparaît qu'il existe des différences nettes dans la propriété qu'ont différents virus de créer des porteurs pendant une période prolongée. Deux des quatre bovins SAT 1 n'ont pas été porteurs de virus pendant plus de quatre semaines. Le virus n'a pu être isolé sur 3 des 6 bovins SAT 3, lorsque ceux-ci ont été examinés la première fois, 14 semaines après infection. Cependant, avec les deux souches de virus A, tous les animaux ont été porteurs pendant au moins 11 semaines et 50% d'entre eux pendant une durée de 6 mois au moins. Le virus a pu être encore isolé sur un des 10 bovins au bout de 15 mois (A 119) et sur 2 des 4 animaux après 14 mois (A. Turquie).

Taux d'anticorps neutralisants chez les animaux porteurs

Une hypothèse fréquemment avancée pour expliquer la persistance de taux élevés d'anticorps pendant de nombreuses années après infection par certains virus a été celle de la persistance du virus dans l'organisme. La différenciation de porteurs du virus aphteux "à long terme" et "à court terme", tant au sein de groupes d'animaux qu'entre différents groupes d'animaux, permet de comparer les titres d'anticorps trouvés pour chaque catégorie. On n'a pas pu trouver de différences appréciables dans les titres moyens d'anticorps entre porteur à court et long terme appartenant à un groupe déterminé, mais, par contre, une différence notable selon les groupes, tant au point de vue du titre que de la persistance des taux d'anticorps, a pu être mise en évidence (tableau 2).

---

* Animal Virus Research Institute, Pirbright, Surrey, Angleterre.

Virulence pour les bovins, du virus isolé sur les animaux porteurs

Les critères pouvant être utilisés pour évaluer la virulence d'une souche de virus déterminée comportent l'estimation de la concentration en virus nécessaire pour produire des lésions sur la langue de bovin et l'observation du caractère, ainsi que de la transmissibilité de la maladie consécutive. Les résultats de l'étude d'un certain nombre de souches isolées sur des animaux porteurs à des périodes diverses, sont présentés au tableau 3. A des fins de comparaison, le comportement du virus d'origine utilisé pour créer l'état des porteurs est également indiqué. Le virus isolé chez des porteurs des souches A 119 et A Turquie a montré un pouvoir infectieux réduit pour la langue du bovin. La gravité des lésions secondaires ne s'est pas avérée moindre sur 13 des 14 animaux utilisés pour le titrage de ces souches. La transmission de la maladie des animaux utilisés pour le titrage, aux bovins réceptifs, s'est effectuée facilement.

La souche de virus SAT 3 Bec 3/64 avait été associée à une maladie naturelle très atténuée. (R.S/ Hedger - communication personnelle). Sur l'un des animaux utilisés pour titrer le virus d'origine, on a pu constater une virulence atténuée (2ème passage sur bovins, Pirbright). Le virus isolé sur des porteurs 14 semaines après infection s'est montré complètement virulent, mais les 4 souches isolées sur un animal, à l'autopsie, 28 semaines après infection présentaient toutes à nouveau les caractéristiques d'atténuation de virulence. Le tableau 3 établit également la comparaison entre les résultats obtenus à l'aide du virus d'origine (récolté fraîchement sur épithélium linguinal) et ceux obtenus avec le passage BHK/I ou BHK/2 du virus isolé sur les animaux porteurs. On peut imaginer que un ou deux passages en culture cellulaire ont pu provoquer en partie la sélection d'une population de virus moins actif. Les préparations BHK 2 de virus récolté après 40 semaines (A Turquie) et 44 semaines (A 119) ont été titrées sur un seul bovin. Les vésicules épithéliales ont été récoltées après 24 heures et titrées sur 2 bovins. Il n'a été noté aucune différence appréciable entre les deux préparations de chaque souche en ce qui concerne la concentration de virus nécessaire pour produire un titre critique 50% sur la langue de bovin.

Détermination des caractères antigéniques des virus isolés sur les animaux porteurs

Des variations ont été obtenues dans le caractère antigénique de souches de virus aphteux, par passage en culture de tissu en présence d'immun-sérum (Hyslop,1965) et par passage expérimental sur bovins immunisés (Hyslop et Fagg. 1965). La possibilité d'apparition naturelle d'une semblable variation sur l'animal porteur a été examinée de la façon suivante. Une série d'échantillons de sérum prélevés sur un animal a été examinée du point de vue de l'activité neutralisante à l'égard du virus d'origine et à l'égard de souches isolées à diverses périodes. Le tableau 4 donne les résultats obtenus pour un animal A 119 (F.E.52).

Le sérum prélevé 9 semaines après infection a présenté des titres d'anticorps correspondant aux trois virus isolé qui étaient environ vingt fois plus bas que ceux correspondant au virus d'origine. Une différence comparable a été notée avec un sérum de référence de bovin A 119 au 21ème jour. Ces différences sont peu à peu tombées à moins de trois fois pour les sérums prélevés après 20 semaines. Ces résultats sérologiques indiquent l'apparition d'une variation antigénique du virus entre la quatorzième et la dix-septième semaine, suivant l'infection de l'animal (les expériences dans lesquelles les bovins ont été exposés à des souches de virus modifié, pulvérisé dans la région rétropharyngée, ont montré que l'anticorps spécifique apparaît sept à quatorze jours plus tard).

II. BOVINS EN CONTACT AVEC DES SOUCHES DE VIRUS MODIFIE

Des chercheurs ayant étudié avant nous la persistance de l'excrétion du virus chez les bovins vaccinés à l'aide de souches modifiées du virus aphteux, ont fait porter leurs examens sur le sang, la salive, l'urine, le lait e les ganglions lymphatiques (Goldsmit, 1962, Schneider et Bengelsdorff, 1962, Geering et Pay, 1963). D'autres chercheurs (Mowat, 1961 et Skinner et Bracewell - communication personnelle ont examiné les muscles et divers organes internes dans leurs études de caractéristiques du développement des souches modifiées sur les bovins.

Le virus a pu être mis en évidence dans de nombreux tissus, sécrétions et excrétions, au cours de la première semaine, suivant la vaccination, mais sa mise en évidence n'a pas été signalée après le 8ème jour.

Burrows (1966) a montré que l'on trouve des souches de virus virulent dans la région pharyngée des animaux porteurs. L'éventualité que cette région soit également le lieu où persiste le virus modifié a été étudiée sur des animaux utilisés pour les tests d'innocuité et d'immunité de souches de vaccin modifié. Des essais, tendant à créer des porteurs de virus modifié au niveau du rétropharynx. Les résultats de ces travaux (tableau 5) font apparaître qu'un petit pourcentage seulement de bovins ont été porteurs de virus après inoculation intramusculaire de virus modifié. Après inoculation de la langue ou pulvérisation au niveau du rétro pharynx, il est apparu jusqu'à 50% de porteurs avec certaines souches modifiées.

On n'a pas encore mis au point de tests pour déterminer les "caractéristiques de virulence" des souches modifiées, isolées sur les animaux porteurs.

III. OVINS EN CONTACT AVEC DES SOUCHES DE VIRUS ACTIF

Des expérimentations ont été conduites pour déterminer si, à la suite de contact avec le virus aphteux, était crée chez les ovins l'état de porteur. Les moutons ont été infectés, soit par inoculation au niveau du bourrelet coronaire d'un pied, soit par contact. La réussite de l'infection a été confirmée sur tous les animaux par la mise en évidence de la virémie consécutive. Les animaux ont fait l'objet de prelévements à intervalles périodiques, à l'aide d'un matériel de prélèvement modifié, et le pouvoir infectant des échantillons a été analysé par la méthode des plages sur culture de couches monocellulaires BHK.

Selon les souches de virus, on a enregistré des différences quant au nombre des animaux présentant une infection persistante et quant à la durée de cette infection (tableau 6).

Les résultats font apparaître que la majorité des moutons ne sont plus porteurs de virus, quatre mois après infection. L'analyse des prélèvements post-mortem a montré que le virus était présent dans l'épithélium du pharynx et des amygdales, pendant la période où l'animal est porteur.

IV. PORCINS EN CONTACT AVEC DES SOUCHES DE VIRUS VIRULENT

Cinquante-six porcs (4 souches de virus) ont fait l'objet d'examens post-mortem entre 10 et 28 jours après qu'ils aient été infectés. Le virus a été recherché sur des prélèvements provenant de l'appareil digestif, respiratoire, uro-génital, ainsi que du système lymphatique et des epithéliums de surface. D'infimes quantités de virus ont pu être isolées sur environ 2% des lésions podales, dix jours après infection, mais la persistance du virus après ce délai n'a pu être mise en évidence.

REFERENCES

Burrows, R. (1966). J. Hyg., Camb., 64, 81

Geering, W.A. and Pay, T.W.F. (1963). Proc. 17th Int. vet. Congr. Hanover, Vol. 1, 513

Goldemit, L. (1962). Bull. Off. int. Epiz. 57, 789

Hyslop, N. St F. (1965). J. gen. Microbiol., 41, 135

Hyslop, N. St.G. and Fagg, R.H. (1965). J. Hyg., Camb., 63, 357

Mowat, G.N. (1961). Res. vet. Sci., 2, 153

Schneider, B. and Bengelsdorff, H.J. (1962). Bull. Off. int. Epiz., 57, 689

Sutmöller, P. and Gaggero, A. (1965). Vet. Rec., 77, 968

Van Bekkum, J.G. Frenkel, H.S., Frederiks, H.H.J. and Frenkel, S. (1959) Tijdschr. Diergeneesk., 84, 1159

TABLEAU 1. **Détail des animaux utilisés pour l'étude de la durée de l'etat de porteur de virus**

Virus	Nbre de bovins	Periodicité des prélèvements (exprimées en nombre de semains après l'infection)	Nombre de fois où ont été effectuées les prélèvements
A-119	10	2 - 65	26
A Turkey 19/64	4	4 - 61	23
SAT 1 SA 13/61	4	4 - 31	5
SAT 3 Bec 3/64	6	14 - 25	9
"	6	2 - 8	7

TABLEAU 2. Taux d'anticorps neutralisants des bovins porteurs de virus

Virus	Nbre d'animaux	Catégorie de porteurs	Nombre de semaines après l'infection							
			4	9	14	25	28	36	54	60
A - 119	5	> 7 mois	-	2,82	3,30	3,45	3,46	3,53	3,04	2,91
		< 7 mois	-	3,04	3,03	3,39	3,38	3,28	2,84	2,77
SAT 3	3	> 3 mois	2,75	-	2,50	2,38	2,25	SACRIFIES		
	3	< 3 mois	2,82	-	2,69	2,53	2,20			

Moyenne géometrique des titre d'anticorps (Colorer test)

(Log inverse)

TABLEAU 3. Virulence des souches du virus d'origine et du virus isolé

Virus	Isolement	Préparation	Infectivité			Étendue des lesion linguales	nombre de pieds	Trans-mission
			Langue1/ bovine	Souris i/p 1/	BHK 2/			
A-119	Original	Epithelium	6,1	7,5	7,2	+ +	4 4	NT
	22 semaines	BHK/2	4,2 4,6	7,9	7,9	+ +	4 4	NT
	44 semaines	BHK/2	4,3	7,3	7,4	+	4	NT
		Epithelium	5,7 4.7	7,3	7,4	+ +	4 4	NT
	60 semaines	BHK/2	3,4 2.0	6,7	6,2	+ -	4 4	+ +
A-Turkey	Original	Epithelium	6,6 5,8	7,8	NT	+ +	4 4	NT
	18 semaines	BHK/2	3,8 4,2	7,2	7,3	+ +	4 4	+
	40 semaines	BHK/2	4,8	6,7	6,6	+	4	+
		Epithelium	5,7 4,0	6,8	6,8	+ +	4 4	+
	56 semaines	BHK/2	5,0 4,6	7,0	6,8	+ +	4 0	+ +
SAT 3	Original	Epithelium	4,9 5,1	6,7	6,3	+ -	0 4	NT
	14 semaines	a) BHK/1	4,7 5,7	7,5	7,0	- -	4 4	NT
		b) BHK/1	4,7 5,8	7 5	7,0	- +	4 4	NT
	1	BHK/2	2,8 $<1,5$	7.0	7,0	+ -	4 0	NT
	2	BHK/2	3,7 $<1,5$	6,8	7,1	+ -	0 0	NT
	28 semaines 3	BHK/2	3,0 $<1,5$	6,5	6,3	+ -	4 0	NT
	4	BHK/2	3,2 $<1,5$	6,5	7,3	+ +	2 3	NT

1/ ID 50/ml 2/ pfu/ml 3/ infection subclinique NT. non testée

TABLEAU 4. Activité neutralisante des sérums de génisse FE 52 vis-à-vis des souches A 119

VIRUS	Nombres de semaines après l'infection									
	9	14	15	20	25	28	32	36	41	47
A -119 d'Original	3.31	3.50	3.53	3.53	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.53
FE 52 22 semaines	2.03	2.20	2.72	2.95	3.10	3.35	3.40	3.40	3.15	3.10
FE 52 44 semaines	2.15	2.38	2.64	3.00	3.00	3.12	3.07	3.15	3.00	3.00
FE 52 65 semaines	2.15	-	-	-	-	-	-	-	-	3.00

Inverse du log. du titre sérologique (Methode des plages - serum variable/virus constant)

TABLEAU 5. L'état de porteur de virus chez les bovins après contact avec des souches de virus aphteux modifié pour les bovins

Virus	Voie d'inoculation	Nombre de bovins	Semaines après L'inoculation où sont effectués les prélèvements	Nombre de porteurs
A - Kemron E	i/m r/p	12 8	2, 3, 4. 2, 3, 4.	0 4
C - 997 E	i/d i/m r/p	12 56 4	2,3,5,6. 2,3,4,5. 2,4,6,8.	4 4 1
SAT 1 RV 11 mo	i/d i/m	12 28	3,9,11,12 9,10,11,13,14,16.	0 0
SAT 2 Rho 1 mo	i/m r/p	12 8	2,3,4. 2,3,4.	2 1/ 1
SA 3 SA 57/59 mo	i/d i/m	12 20	8,9,11,12 9,10,11,13,14,16.	0 0

1/ Décelés sur prélévements d'autopsie

i/m - intramusculaire

i/d - intradermolinguale

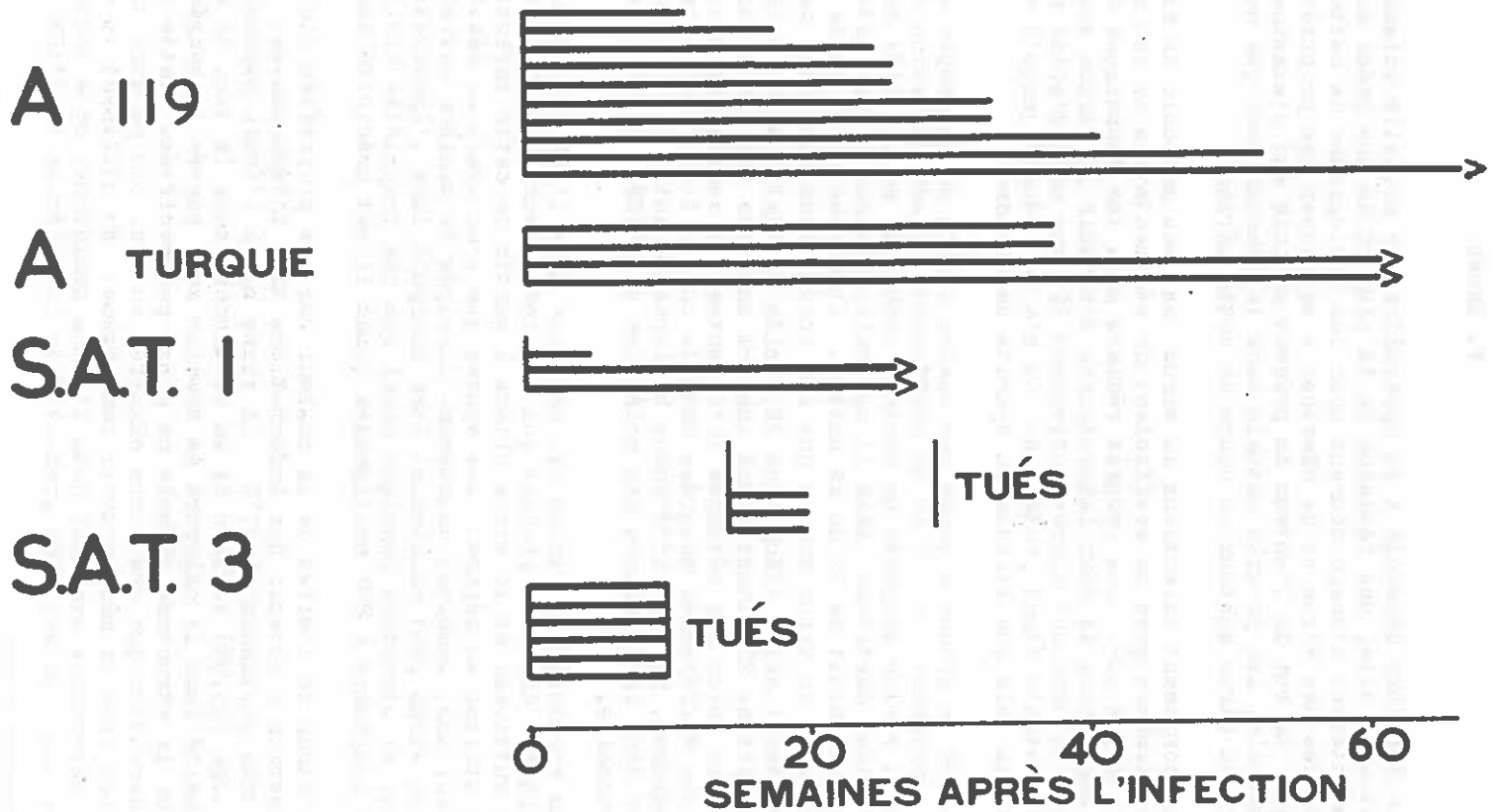
r/p - pulvérisation rétro-pharyngée

TABLEAU 6. Durée de l'état de porteur de virus - Ovins

Virus	Nombre d'animaux	Semains après l'infection							
		2	3	4	6	8	12	15	20
A- 119	7	7 1/	7	7	6	3	1	1	0
A - Iraq 24/64	8	7	8	7	7	4	4	2	1
O - Israel 1/63	15	-	8	9	8	4	1	0	0
SAT 1 SA 13/61	8	6	-	6	5	6	3	1	0

1/ Nombre d'animaux sur lesquels le virus a été isolé

DURÉE PENDANT LAQUELLE LES BOVINS PEUVENT RESTER PORTEURS DE VIRUS



ANNEXE 13

LA STRUCTURE DU VIRUS APHTEUX : REVUE DE L'ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

par

F. BROWN

La dernière décennie a vu apparaître une nouvelle science, la biologie moléculaire, et avec elle, une révision de la plupart de nos idées sur la structure des virus. Il est maintenant d'usage courant pour les biologistes de cette discipline de se référer aux molécules des virus et de chercher à expliquer les propriétés des virus en termes chimiques. Le but de l'auteur du présent article est d'examiner dans le cadre de cette étude générale, les progrès actuels dans la connaissance que nous avons acquise de la structure du virus aphteux au cours de cette période.

Le composant infectieux du virus est une molécule de ribonucléoprotéine d'environ 25 mμ de diamètre avec un coefficient de sédimentation de 140 S et un poids moléculaire d'environ $6,5 \times 10^6$. Les progrès récents dans les techniques de centrifugation ont permis aux chercheurs de deux laboratoires d'obtenir le virion sous une forme hautement purifiée. Il contient approximativement 32 pour cent d'acide ribonucléique (ARN), la fraction restante étant protéique. On n'a pas décelé jusqu'à maintenant d'autres constituants tels que lipides ou hydrate de carbone.

L'ARN se présente comme une chaîne simple de nucléoprotéides avec un poids moléculaire approchant 3×10^6 et un coefficient de sédimentation de 37 S. Au contraire, la protéine du virion comporte un certain nombre de sous-unités distinctes. Ce nombre n'est pas connu avec certitude, mais il apparaît, d'après l'observation au microscope électronique, qu'il serait de 32 ou 42 unités. L'analyse chimique de l'ARN de deux types immunologiques du virus montre que les proportions relatives des nucléo-protéides sont les suivantes : acide adénylique 26, acide cytidylique 28, acide guanylique 24 et acide uridylique 22. Etant donné que ces analyses ont été effectuées dans deux laboratoires selon des méthodes différentes, il semble improbable que l'on doive trouver des différences marquées dans la composition fondamentale des divers types immunologiques. Si les différences biologiques entre les divers types du virus se reflètent dans la structure des molécules de l'ARN, une analyse plus détaillée peut être nécessaire.

La virulence du virion est contenue dans l'ARN. L'extraction du virus purifié avec du phénol donne un produit qui est infectieux, tant pour les animaux que pour les cellules cultivées et le virus obtenu à partir de cette infection, ne se distingue pas de celui utilisé au départ. Les doutes que l'on avait au début, concernant la virulence due au seul ARN, semblent maintenant dissipés de manière satisfaisante. L'ARN virulent extrait du virus peut maintenant être manipulé dans l'éprouvette avec une certaine assurance; sa structure physique ainsi que des propriétés biologiques peuvent se conserver très longtemps à 200 centigrades quand il est précipité dans l'alcool éthylique.

L'étude de l'effet de la chaleur sur les propriétés biologiques et physiques du virus a permis d'obtenir des informations très intéressantes. La virulence du virus diminue très rapidement à 37°C. Le virus mis à l'étude pendant 24 heures à 37°C, a perdu 3 logs (99,9%) environ de sa virulence, mais le taux de sédimentation en lactose et la densité dans le chlorure de caesium sont restés inchangés, ce qui permet de penser que la structure globale ne s'est pas modifiée. Cette conclusion a été renforcée par l'observation que des virus chauffés ou non, ont pu être transformés en vaccins ayant à peu près le même pouvoir immunogène. En utilisant du virus qui était marqué de façon déterminée avec 32P dans l'acide nucléique, on a montré que la perte de virulence est due à la scission graduelle de la molécule de l'ARN.

---

* Plum Island Animal Disease Laboratory, Long Island, Etats-Unis.

Le chauffage à 56°C entraîne une diminution beaucoup plus rapide de virulence. Cette diminution pouvant même être de 5 logs en moins de cinq minutes. La perte de virulence dans ce cas, cependant, est due à la dislocation du virus en ARN et sous-unités protéiques, l'ARN étant libéré, sous forme de molécule virulente intacte. L'observation que les sous-unités protéiques libérées de cette façon, ne sont pas immunigènes, est cependant d'une grande portée.

L'effet disruptif de la chaleur à 56°C peut également être obtenu par réduction du pH du virus au-dessous de 6,5. Cette sensibilité extrême à des traces d'acide est une propriété caractéristique du virus aphteux. Comme avec la dégradation à 56°C, les produits de la dislocation au pH 6,5 ne sont pas immunigènes. Autant qu'on puisse en juger par des tests de diffusion en gélose et par des indications fournies par la sédimentation, les sous-unités produites par l'éclatement du virion à 56°C, ou au pH 6,5 sont identiques à la protéine fixant le complément spécifique du virus, présente des suspensions du virus obtenu à partir de cellules infectées. Dans ce cas également, la sous-unité protéique n'est pas immunigène. Les structures des sous-unités de particules de virus 25 mu et celles des particules trouvées dans des tissus infectés ou produites par éclatement du virion étant très voisines, il est assez surprenant que la sous-unité protéique ne soit pas immunigène, si l'on considère en particulier les travaux récents effectués avec d'autres virus indiquant que les sub-unités sont immunigènes. Tous les éléments accumulés jusqu'ici apportent la ferme conviction que, en ce qui concerne le virus aphteux, son pouvoir immunigène dépend de l'intégrité de la molécule virale; toute méthode de préparation des vaccins inactivés devrait obéir à la nécessité de préserver cette structure moléculaire.

C'est sur ce fond d'informations relatives à la structure du virus que nous avons récemment étudié les effets de l'enzyme protéolytique-trypsine sur les propriétés du virus. Nous savions que depuis un certain temps des suspensions virales brutes perdent environ 2-3 logs de virulence lorsqu'elles sont mises à l'étuve pendant une courte période à 25°C, avec une concentration de 1 mg de trypsine par ml. Autant que nous ayons pu nous en assurer avec les méthodes alors disponibles, l'ARN du virus est resté intact, parce que la virulence de l'ARN extrait du virus inactivé par la trypsine était aussi élevée que celle de l'ARN provenant du virus non traité. Ceci a été confirmé par l'examen des propriétés physiques de l'ARN extrait du virus inactivé par la trypsine. Il est ainsi apparu que l'action de la trypsine s'exerçait sur la couche protéique.

Des expériences effectuées avec des virus purifiés marqués avec 32_p (phosphore 32), ont montré que le virus inactivé par la trypsine, ne se fixe pas aux cellules réceptives. Ceci fait penser que l'action inactivante est due soit à la formation d'un complexe trypsine-virus, soit à la suppression d'une fraction de la structure du virus qui est indispensable pour la fixation à la cellule susceptible. Si la première hypothèse était correcte, nous nous attendrions à pouvoir isoler du virus virulent, du complexe virus-trypsine, en dénaturant la protéine avec de l'Arcton (celui-ci est très efficace pour la dissociation des mélanges, virus-sérum anti). Tous nos efforts dans ce sens ont jusqu'à maintenant été vaincus. La seconde hypothèse, à savoir que l'enzyme a enlevé une partie intégrante du virus, a été examinée par l'étude de l'action de la trypsine sur du virus dont la protéine a été marquée de façon déterminée avec des acides aminés radioactifs. Du virus marqué de cette façon a été mis à l'étuve avec de la trypsine puis centrifugé en gradients de densité (lactose). La répartition de la radioactivité dans le tube a été alors comparée avec un tube témoin contenant du virus non traité qui avait été centrifugé exactement dans les mêmes conditions. Alors qu'avec le virus témoin on a eu une seule pointe de radioactivité à une position correspondant à un coefficient de sédimentation de 140 S, on a eu avec le virus traité, en plus de cette pointe, une petite pointe près du haut du tube correspondant à des composés de faible poids moléculaire. En outre, la légère densité du virus

inactivé par la trypsine était légèrement supérieure à celle du virus non traité. Cette augmentation de densité correspondrait à la perte de protéine du virus. Finalement, le virus traité a donné un vaccin inactivé très inférieur lorsqu'il était inactivé avec de l'acétyléthyleneimine.

Nous n'avons pas pu jusqu'à ce jour déceler au microscope électronique de modifications structurelles du virus traité par la trypsine. Il semble cependant peu douteux qu'une modification marquée a dû se produire et il est probablement aussi vrai que nos idées sur la structure du virus doivent être révisées à la lumière de ces expériences.

ANNEXE 14

MISE EN EVIDENCE D'UN TROISIEME COMPOSANT ANTIGENIQUE DE LA FIEVRE APTHEUSE

par K.M. Cowan et J.H. Graves

Brown et Crick ont montré que les liquides de culture de tissus et les liquides vésiculaires obtenus à partir de bovins ou de cobayes infectés par le virus de la fièvre aphteuse (FMDV) donnant deux bandes de précipitines lorsqu'ils sont examinés par les techniques d'immunodiffusion. L'une d'elles est due aux particules associées au pouvoir infectieux, qui ont un diamètre de 23 millimicrons et un coefficient de sédimentation (taux S) de 140 S. L'autre bande est due aux subunités protéiques des particules de virus qui ont un diamètre approximatif de 7 mμ et un taux S de 12 S. Ces deux composants seront désignés dans l'exposé qui suit par les termes de composants 140 S et 12 S.

Les études d'immunochimie récemment entreprises dans notre laboratoire ont nécessité la préparation de virus purifié type A, souche 119 (FMDV, A 119). Dans un premier temps du procédé de purification, les liquides de cultures cellulaires de reins de jeunes hamsters (BHK) ont été concentrés au centuple, soit par précipitation en sulfate d'ammonium semi-saturé ou en méthanol, soit par ultra-filtration. A l'examen par la technique de précipitation en gélose d'Ouchterlony, trois bandes de précipitines ont été obtenues avec ces liquides de culture concentrés bruts. Les liquides témoins traités de la même manière n'ont pas donné de réactions. La manifestation des trois composants antigéniques et la méthode d'identification de l'antigène responsable d'une bande de précipitine donnée, apparaissent sur la Fig. 1.

Un mélange de sérum de cobayes infectés a été placé dans la cupule centrale. L'antigène concentré brut a été placé dans les cupules désignées par BHK. Les cupules portant la mention 140 S ont reçu du virus purifié préparé par deux cycles d'ultracentrifugation en gradients de densité (cecS) selon la technique de Bachrach, Trautman et Breese (2). L'antigène 12 S a été préparé par dégradation au ph 5 d'une particule 140 S purifiée. Le troisième antigène qui sera désigné ci-après par les lettres V I A ou antigène du "virus associé à l'infection", pour des raisons à débattre, a été séparé des composants 140 S et 12 S par chromatographie sur diéthylamino-éthyl (DEAE) cellulose. La position relative a été invariablement, comme le montre la figure, pour les bandes 140 S le plus près de la cupule d'antigène, la bande 12 S au milieu et la bande de l'antigène VIA le plus loin de la cupule d'antigène.

Afin d'établir que l'antigène VIA n'était pas particulier aux cultures cellulaires BHK infectées, du liquide vésiculaire de cobayes infectés et des extraits d'épithéliums linguaux de bovins infectés ont été concentrés par différentes méthodes. Ces préparations contenaient de l'antigène VIA qui donna une réaction identique à l'antigène VIA produit en culture de tissus. Il apparaît que l'antigène VIA est antigéniquement identique, quelle que soit la source de virus à partir de laquelle il est obtenu.

Quelques caractéristiques de l'antigène VIA ont été comparées à celles des composants 140 S et 12 S en utilisant, à cet effet, la technique de précipitation en gélose. Quelques-uns des résultats sont résumés au tableau 1.

L'ultracentrifugation en gradients de densité saccharose a montré que l'antigène VIA a un coefficient de sédimentation moindre que celui du sérum bovin. La dimension relativement réduite de l'antigène VIA a été en outre démontrée par son élution du Sephadex G-100 retardée, indiquant un poids moléculaire inférieur à 100 000. Ainsi qu'il a été dit plus haut, le VIA a pu être séparé des composants 140 S et 12 S par la chromatographie sur DEAE-cellulose. Ceci est dû au fait que les particules 140 S et 12 S sont éluées à des concentrations salines inférieures à celles nécessaires pour l'antigène VIA. L'antigène VIA précipitant a disparu après chauffage à 50° pendant 30 minutes et une perte marquée de l'antigène était nette déjà à 45°C. Le VIA s'est montré un peu plus stable que le 140 S mais considérablement moins que le composant 12 S à des pH plus faibles.

Il était d'un intérêt évident de déterminer si le VIA était un composant du virus. Pour cela, du sérum-anti de cobaye fut absorbé avec des particules purifiées 140 S et 12 S (Fig.2). Ceci constituait un essai pour déterminer l'efficacité du

sulfate d'ammonium comme précipitant des antigènes VIA et 12 S, ce qui fut confirmé. Le concentré brut de BHK utilisé dans cette expérience particulière avait été ultracentrifugé pour obtenir des particules 140 S et il était en conséquence dépourvu de cet antigène. Avec du sérum non absorbé, les bandes 140 S et 12 S sont nettes avec une préparation 140 S partiellement dégradée, et le liquide brut BHK donna des bandes VIA et 12 S exactement comme les précipités de ce matériel dans le sulfate d'ammonium saturé au 1/3 et au 1/2. Après absorption avec les particules 140 S ou 12 S, les anticorps furent spécifiquement enlevés sans effet sur l'anticorps correspondant à l'antigène VIA ou sur l'anticorps correspondant à l'autre antigène. Ceci permet de penser soit que l'antigène VIA était un antigène intérieur ou masqué dans la particule de virus, soit qu'il ne faisait pas partie intégrante du virus. Scharff, Maizel et Levintow (3) ont montré que le virus de la poliomyélite est dégradé par la guanidine ou l'urée en sous-unités qui sont peut-être des fractions de chaînes de polypeptides distinctes du point de vue antigénique de la particule de virus intacte. Des conclusions identiques ont été formulées par Rappaport, Siegel et Haselkorn (4) en ce qui concerne le virus de la mosaïque jaune du navet. La possibilité que l'antigène VIA soit constitué par des chaînes polypeptidiques non assemblées du virus, a été examinée en dégradant du virus purifié avec du chlorhydrate de guanidine 6.3 M avec de l'urée 8 M et par traitement au pH 5. Le Dr. Vande Woude de notre laboratoire a montré que l'urée 8 M dégradait le virus aphteux en petites sous-unités, probablement des chaînes de polypeptides. Ainsi que le montre la Fig.3, le traitement au pH 5 a dégradé le virus jusqu'au composant 12 S, tandis que la guanidine et l'urée le dégradaient à un point tel qu'il ne présentait plus de réaction avec le sérum-anti. En conséquence, l'antigène VIA ne semblerait pas équivalent à l'antigène soluble du virus polyomiélitique décrit par Schraff et al (3). Bien qu'elle ne soit pas définitive, notre idée est que le VIA n'est pas un composant du virus, mais que sa formation est consécutive à l'infection par le virus. C'est pour cette raison que nous l'avons appelé provisoirement VIA ou antigène "associé à l'infection par le virus". L'idée d'une association avec l'infection est en outre justifiée par le fait que les animaux infectés avec le virus aphteux, produisent des anticorps correspondant aux trois antigènes (Fig. 4) . Ces sérums ont été prélevés sur un bouvillon à des jours différents après infection avec le virus aphteux et du sérum de cobaye infecté a été utilisé comme sérum de contrôle. La bande intérieure est due aux particules 140 S, celle du milieu au composant 12 S et la bande extérieure à l'antigène VIA. L'anticorps a été mis en évidence dès le 7 ème jour suivant l'infection et a persisté bien au-delà de 240 jours. D'un autre côté, les bovins immunisés avec une préparation de virus inactivé par un adjuvant huileux, produisent des anticorps correspondant seulement aux composants 140 S et 12 S (Fig. 5). La bande intérieure était encore due aux particules 140 S et la bande voisine au composant 12 S; seul, le sérum témoin des cobayes infectés, avait des anticorps correspondant à l'antigène VIA. Les titres maxima des sérums, évalués par le test de neutralisation et de fixation du complément étaient aussi élevés que ceux des sérums d'animaux infectés.

Il existe sept types sérologiques de virus aphteux et, il était intéressant de déterminer à quel type se rattachait l'antigène VIA. Les sérums-antis correspondant aux sept types sérologiques ont été testés avec l'antigène brut ainsi qu'avec les antigènes 140 S et VIA (Fig. 6) du type A. Comme on peut le voir, les antigènes 140 S et 12 S ont réagi seulement avec des sérums au type A. Avec l'antigène VIA, des réactions ont cependant été obtenues avec les sérums-antis correspondant aux types O, C, SAT 1 et Asia 1, mais non avec SAT 2 et SAT 3. Nous avons toutefois examiné d'autres sérums et trouvé un sérum bovin anti SAT3 qui réagissait avec l'antigène VIA. Les sérums-antis, correspondant à des virus variés, tels que ceux de la peste bovine,de la peste porcine, de la stomatite vésiculeuse et l'exanthème vésiculaire, ainsi que d'autres maladies, n'ont pas donné de réactions. Ainsi l'antigène VIA, apparaît spécifique de la maladie, mais ne se rattache pas à un type déterminé. Cette découverte peut avoir des conséquences importantes sur les tests de fixation du complément ou les méthodes d'immunofluorescence employées pour l'identification des types.

Enfin, il était intéressant d'obtenir une première information sur le moment de l'apparition de l'antigène VIA et de l'antigène viral dans les cultures de tissus infectés avec le virus aphteux. Une série de cultures a été infectée et les cellules

ont été recueillies à diverses périodes suivant l'inoculation. L'antigène des cellules éclatées a été titré par les tests de précipitations, les résultats en sont indiqués à la Fig. 7.

L'antigène VIA était présent dès la 360ème minute suivant l'inoculation, alors que l'antigène 140 S, n'était mis en évidence qu'au bout de 600 minutes environ. L'apparition de l'antigène VIA avant l'antigène viral a été confirmée par des expériences ultérieures, en utilisant pour déceler les antigènes, la méthode plus sensible de fixation du complément.

En conclusion, nous avons mis en évidence dans les liquides de tissus infectés avec le virus aphteux un composant antigénique qui ne semble pas faire partie intégrante du virus. Un examen de la nature de l'antigène VIA et du moment de son apparition dans le processus infectieux, nous a conduits à l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'un composant, compris dans la synthèse du virus. Summers, Maizel et Darnell(5) ont apporté la preuve de la formation de huit à dix protéines spécifiques du virus ne faisant pas partie de la capside dans les cellules HeLa infectées par le virus poliomyélitique.

Une protéine régie par le virus, telle que la polymérase de l'ARN liée à l'ARN, pourrait être prise en considération aux fins de discussions. Selon Baltimore, Franklin, Eggers et Tamm (6), ainsi que d'autres auteurs, la formation de cette enzyme est la conséquence de l'infection du virus et sa synthèse doit être continue au cours de la synthèse de l'ARN viral. Une telle enzyme serait probablement considérée comme une protéine étrangère par l'hôte infecté et sa synthèse poursuivie durant la riposte du virus, pourrait fournir une masse antigénique suffisante pour stimuler la formation d'anticorps par les animaux.

Des expériences sont en cours en vue d'établir la nature de l'antigène VIA et de déterminer quel rôle il pourrait éventuellement jouer dans le processus de riposte du virus.

TABLE 1. - Résumé de quelques caractéristiques des antigènes du virus infectieux

	Virus	Sous-unités de virus	Antigène VIA
Taux S	140 S	12 S	< 4 S
Dimension	20-15 mμ	7-9 mμ	Inconnue
Exclu du Sephadex G-25	oui	oui	oui
Exclu du Sephadex G-50	oui	oui	oui
Exclu du Sephadex G-100	oui	oui	non
Exclu du Sephadex G-200	oui	oui	non
Elution du DEAE-cellulose au pH 7.6 conc. de CINA de :	< 0,15 M	< 0,15 M	0,3 M ou >
Perte du pouvoir précipitant 30 min. à °C :	60	75	50
Perte du pouvoir précipitant pH :	6,2	< 3,1	5,1

Bibliographie

I. Brown, F. et Crick, J. (1958). Application of agar gel precipitin tests to the study of the virus of foot-and-mouth disease. Virology 5, 133-134

2. Bachrach, H.L., Trautman, R. et Breese, S.S. Jr. (1964). Chemical and physical properties of virtually pure foot-and-mouth disease virus. Am. J.Vet. Res. 25, 333-342

3. Scharffn M.D., Maizel, J.V. Jr et Levintow L. (1964) Physical and immunological properties of a soluble precursor of the poliovirus capsid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51 329-337.

4. Rappaport, I. Siegel, A. et Haselkorn, R. (1965). Influence of the state of subunit aggregation on the antigenic specificity of TMV and TYMV. Virology 25 325-328.

5. Summers, D.F. Maizel, J.V. Jr et Darnell, J.E. Jr,(1965) Evidence for virus specific noncapsid proteins in poliovirus-infected Hela cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 505-513.

6. Baltimore, D. Eggers, H.J. Franklin, R.M.et Tamm, I.(1963).Poliovirus-induced RNA polumerase and the effects of virus specific inhibitors on its production. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 49 843-849.

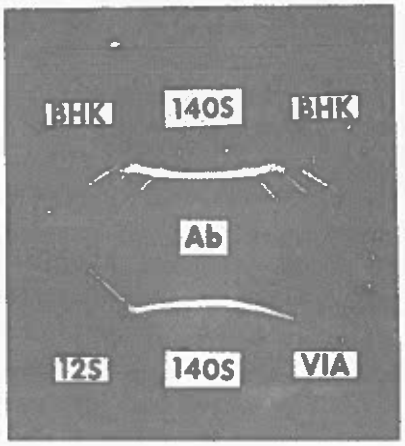


Fig. 1.- Traînées de précipitine formées avec du sérum de cobaye anti FMDV-A 119 (Ab) et un concentré brut de liquide de culture de cellules rénales de jeunes hamsters infectées par le FMDV-A 119, et des préparations de FMDV-A 119 140 S, 12 S et d'antigène VIA.

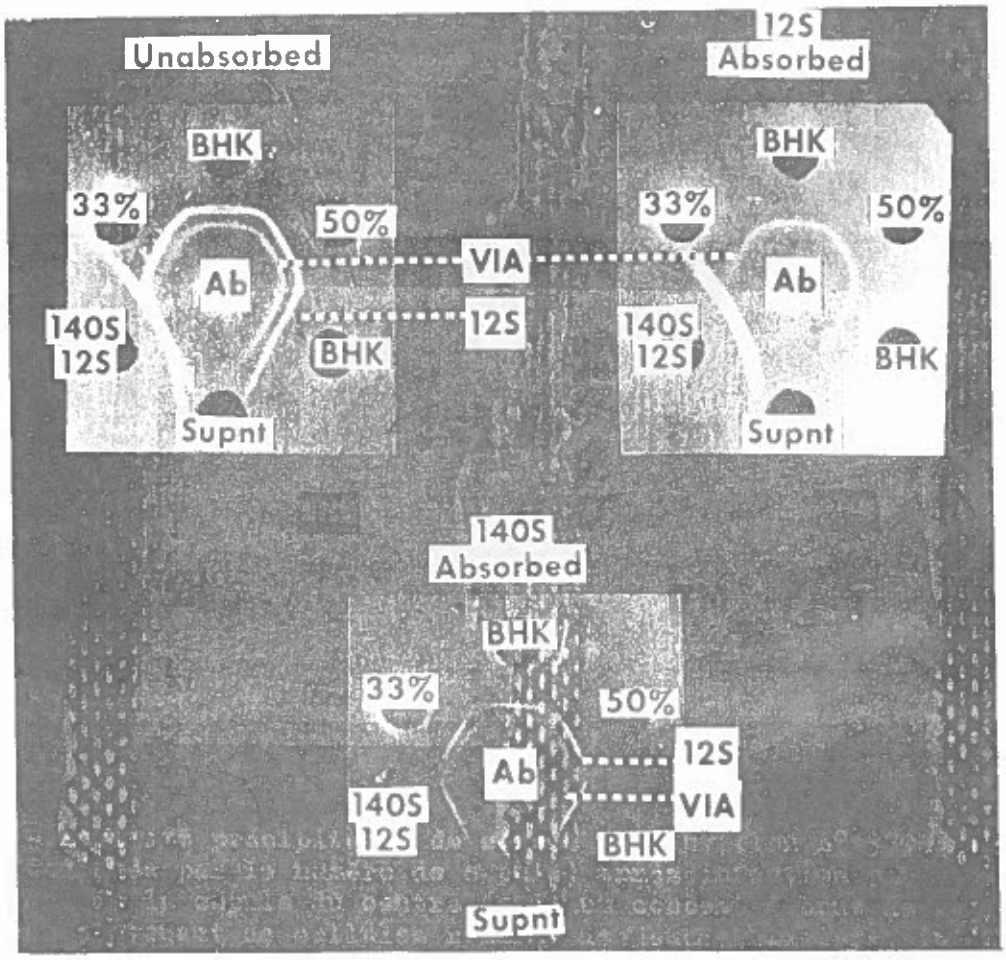


Fig. 2.- Activité précipitante du sérum de cobaye anti FMDV-119 (Ab), après absorption avec des antigènes FMDV-A 119 140 S ou 12 S. Les antigènes étaient un concentré brut du liquide surnageant après ultra-centrifugation de culture de cellules rénales de jeunes hamsters (BHK) infectées avec FMDV-A 119, les précipités du matériel BHK obtenus par précipitation dans du sulfate d'ammonium saturé à 33 pour cent et 50 pour cent, le liquide surnageant de la précipitation dans du sulfate d'ammonium à 50 pour cent (Supnt) et une préparation de FMDV-A 119 140 S et 12 S mélangés.

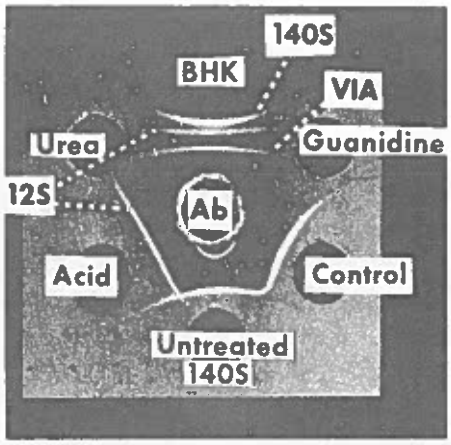


Fig. 3.- Effet du traitement de particules purifiées 140 S du FMDV - A 119, pendant 3 heures à 37° (control) au pH 5 pendant 3 heures (Acid), avec urée 8 M (Urea) au pH 4, ou avec chlorhydrate de guanidine 6,3 M au pH 7,4 (guanidine) - Le matériel d'amorçage 140 S est dans la cupule du bas et un concentré brut du liquide de culture de tissus obtenu à partir de cultures de cellules rénales de jeunes hamsters (BHK) infectées avec FMDV - A 119, dans la cupule du haut. Du sérum de cobaye, anti FMDV (Ab) est dans la cupule du centre.

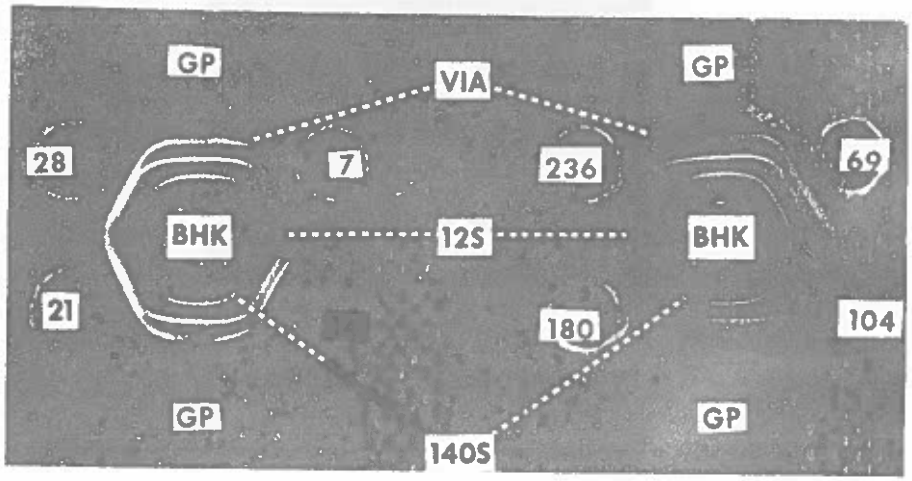


Fig. 4.- Activité précipitante de sérums du bouvillon n° 3790 prélevés à divers jours (indiqués par le numéro de cupule) après infection par le FMCV - A 119. L'antigène de la cupule du centre était un concentré brut de liquide de culture de tissus provenant de cellules rénales de jeunes hamsters, infectées avec FMDV - A 119 S, un mélange de sérum de cobayes infectés avec FMDV - A 119 (GP) a été utilisé comme sérum de contrôle. La bande intérieure de précipitines est due à l'antigène 140 S, celle du milieu, à l'antigène 12 S, et celle de l'extérieur à l'antigène VIA.

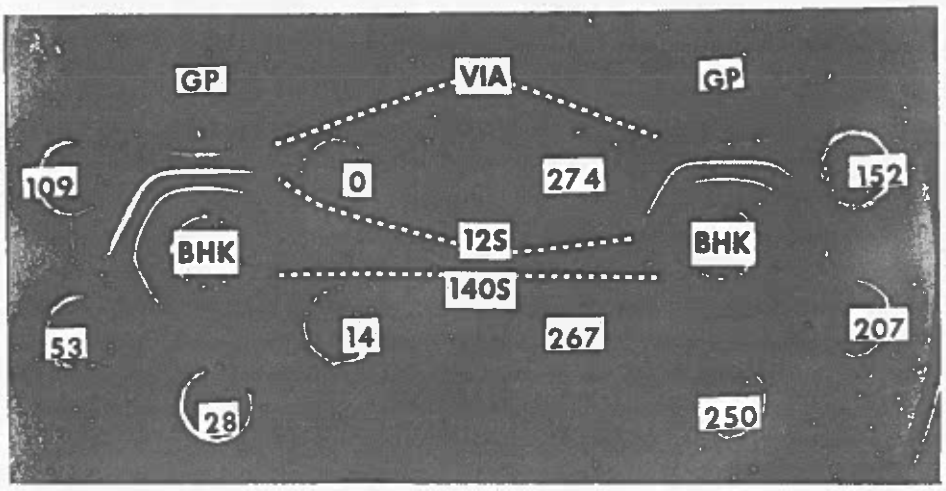


Fig. 5.- Activité précipitante des sérums du bouvillon n° 3760 immunisés avec FMDV - A 119 inactivé par l'acétylèthylénéimine, incorporé dans l'adjuvant d'huile minérale. Les numéros de cellules indiquent le jour de prélèvement suivant l'immunisation. Le bouvillon a été exposé au FMDV virulent de type A, 264 jours après inoculation. Du sérum de cobaye, anti FMDV - A 119 (GP) a été utilisé comme sérum de contrôle. L'antigène de la cupule du centre était un concentré brut de liquide de culture obtenu à partir de cellules rénales de jeunes hamsters infectées avec FMDV - A 119.

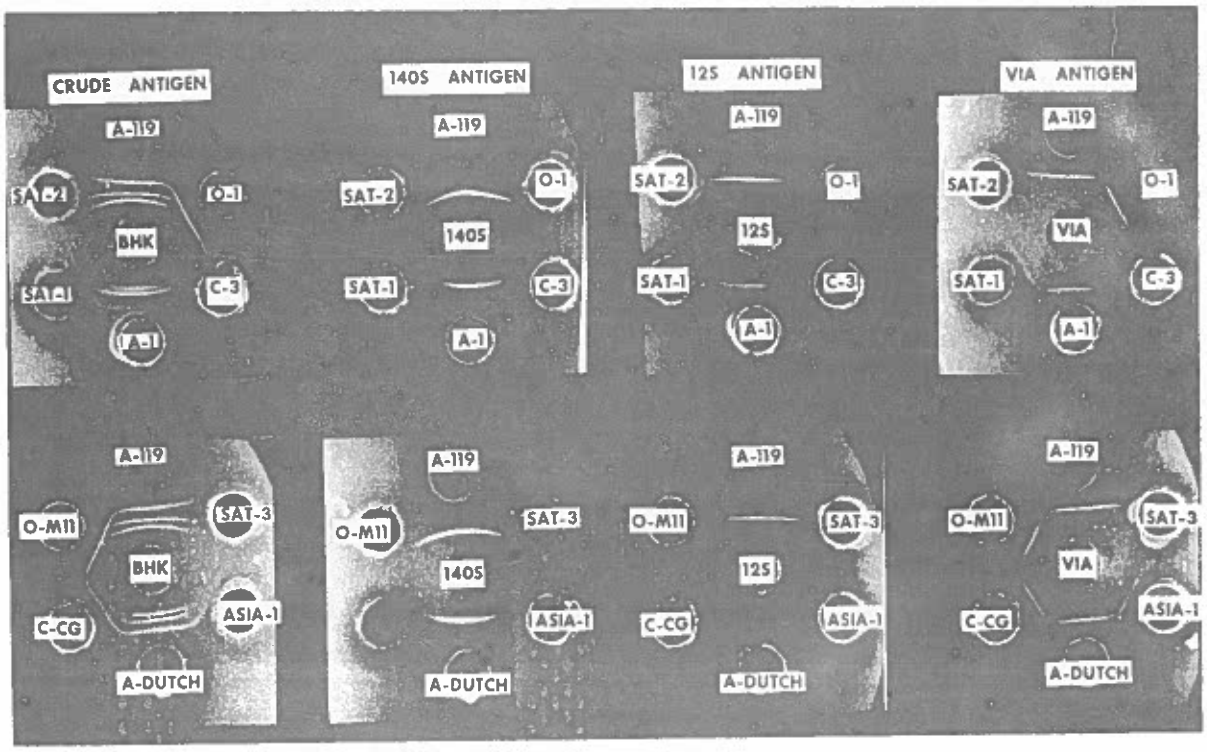


Fig. 6.- Traînées de précipitines obtenues avec un concentré brut de liquide de cultures cellulaires rénales de jeunes hamsters infectées avec du FMDV-A 119, de l'antigène 140 S purifié du FMDV - A 119, de l'antigène 12 S du FMDV - A 119 et de l'antigène VIA du FMDV - A 119, avec du sérum anti de cobaye correspondant aux sept types sérologiques du FMDV. L'antigène était placé dans les cupules du centre.

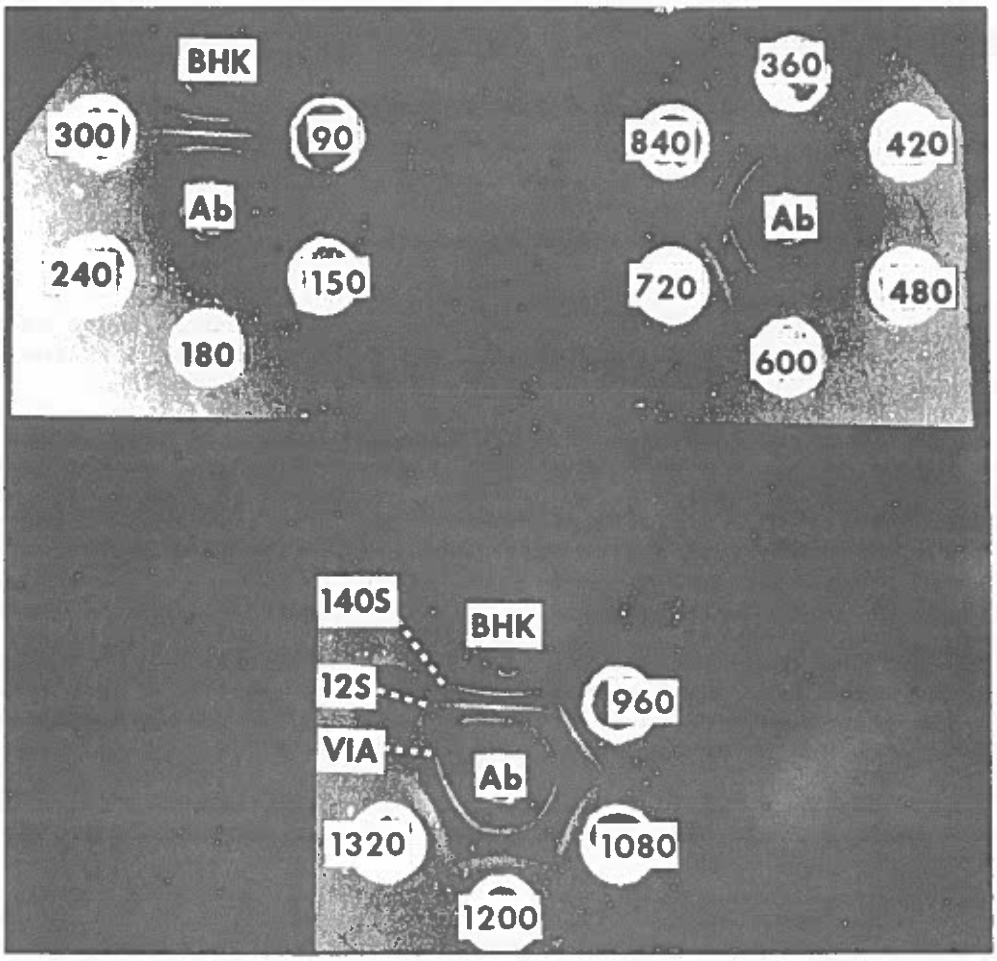


Fig. 7.- Activité précipitante de la phase cellulaire de cultures de cellules d reins de jeunes hamsters, infectées avec du FMDV - A 119. Les cellules ont été prélevées par raclage sur deux bouteilles de prescription aux temps indiqués (minutes), et concentrées à 0,5 ml par précipitation avec du sulfate d'ammonium saturé à 50 pour cent. La cupule du centre a reçu le sérum anti FMDV - A 119 de cobaye et du liquide de culture concentré obtenu à partir de cultures de cellules rénales de jeunes hamsters (BHK) infectées avec du FMDV - A 119 a servi comme antigène de contrôle.

ANNEXE 15

EXPERIENCE ACQUISE AUX PAYS-BAS SUR LA VACCINATION DES PORCINS CONTRE LA FIEVRE APHTEUSE

par

J.G. van Bekkum et P.H. Bool *

Comme les autres années, l'épizootie aphteuse qui s'est déclarée en octobre 1965 et a duré en tout cas jusqu'au printemps de 1966 a été provoquée par le virus du type C. Dans ce cas encore, le porc a été la principale espèce animale affectée.

Comme le montre le tableau ci-joint, l'épizootie a commencé dans le sud du pays, atteignant son intensité maximum vers le milieu de décembre. Dans les provinces situées au nord du Rhin, le taux de morbidité est parvenu à sa valeur la plus élevée vers le milieu de janvier 1966; dans la province d'Overijssel, l'attaque s'est déroulée en deux vagues successives et l'infection n'a pu être jugulée que vers la fin de mai.

Les mesures de lutte appliquées pendant toute la durée de l'épizootie ont été assez uniformes. Quelques heures à peine après leur déclaration, tous les cas suspects ont été examinés par des inspecteurs. Tous les animaux sensibles des exploitations infectées (porcins aussi bien que bovins non vaccinés ou n'ayant reçu qu'une seule dose de vaccin) ont été acheminés vers un lieu central d'abattage. Les carcasses ont été ensuite détruites dans une usine spéciale. Les déplacements des ruminants et des porcins ont été interdits dans une zone de 5 à 8 kilomètres de rayon autour des exploitations infectées. Il est toutefois difficile de maintenir une telle mesure pendant de longues périodes et il a parfois fallu délivrer des permis spéciaux pour autoriser le déplacement des porcs à abattre.

Le recours à la vaccination antiaphteuse des porcins est autorisé depuis 1963. Le vaccin disponible était celui préparé à partir de cultures de Frenkel, employé pour les bovins; de la saponine lui a parfois été ajoutée. On a appliqué ce vaccin monovalent à la dose employée avec les bovins, c'est-à-dire 5 ml. Tous les porcins de chaque exploitation ont dû être vaccinés deux fois, à deux semaines d'intervalle. Des vaccinations de rappel ont été faites tous les trois mois pendant toute la période de risque d'infection aphteuse. La vaccination volontaire, aux frais de l'éleveur, n'a été pratiquée qu'à échelle restreinte.

Au cours de la dernière épizootie, la vaccination a été rendue obligatoire dans deux zones différentes en novembre 1965. Dans chacune de ces zones, l'épizootie tendait à s'aggraver malgré l'application de toutes les mesures habituelles de lutte. On a administré une dose unique d'un vaccin expérimental contenant dix fois la quantité d'antigène utilisée pour les bovins dans un volume de 5 ml. Le virus incorporé aux vaccins provenait de la souche normale du type C, cultivée selon la méthode de Frenkel sur épithélium lingual de bovin. Aucune adjonction de saponine n'a été faite. On a constaté que les vaccins étaient sans danger pour les bovins et protégeaient environ 90% des porcs vaccinés contre une infection par contact trois à quatre semaines après la vaccination.

Les vaccinations ont été pratiquées par des équipes de vaccinateurs et les animaux de toute la région atteinte ont été vaccinés en quelques jours. Des mesures ont été prises pour empêcher que ces équipes ne transportent le virus d'une exploitation à l'autre; une étude approfondie de tous les foyers montre que ces précautions ont été pleinement efficaces. Dans chaque cas, la politique d'abattage systématique a été appliquée aussi longtemps que la maladie a persisté.

---

* Institut vétérinaire central, Amsterdam

Dans la commune de Deurne et les localités voisines, tous les porcins (environ 56 000 bêtes) ont été vaccinés en une seule semaine (9-17 novembre).

Des réactions secondaires négligeables sont apparues chez des porcins vaccinés. Le dernier cas de fièvre aphteuse dans la région a été déclaré le 24 novembre. Dans l'ensemble, des porcs ont contracté la maladie après vaccination dans 26 exploitations. Dans la plupart des cas, la maladie est apparue entre le premier et le cinquième jour suivant la vaccination et, dans un cas, le huitième jour.

Au cours de la deuxième campagne, environ 14 300 porcins ont été vaccinés en une seule journée (25 novembre) dans 271 exploitations du village de Schayk. Ici encore, tous les porcs ont été immunisés. Des cas de fièvre aphteuse ont ultérieurement été diagnostiqués chez des porcins dans 20 de ces exploitations. Le dernier cas s'est manifesté 11 jours après la vaccination.

Dans les deux communes, l'infection a disparu une quinzaine de jours après l'achèvement de la campagne; toutefois, à Deurne, quatre autres foyers ont été enregistrés entre le 2 janvier et le 7 février. Dans deux de ces foyers, qui ont éclaté le 2 et le 11 janvier respectivement, seuls des bovins ont été atteints. L'une de ces exploitations n'élevait pas de porcs; dans la deuxième, ces animaux n'ont accusé aucun symptôme. Les renseignements disponibles donnent à penser que, dans les deux cas, le virus a été introduit de l'extérieur de la zone vaccinée.

Dans un troisième foyer, déclaré le 29 janvier, les porcs atteints avaient été introduits dans l'exploitation après la campagne de vaccination. Aucun des sujets vaccinés n'a manifesté de symptôme. Dans une quatrième exploitation, on a constaté le 7 février qu'un certain nombre de porcs vaccinés avaient contracté la maladie. Dans ce cas, l'origine de l'infection n'a pu être établie.

A Schayk, le dernier foyer a éclaté le 11 décembre. L'exploitation en cause n'élevait pas de porcs.

Depuis la fin de décembre, des vaccins de l'ancien type, c'est-à-dire ceux utilisés pour les bovins, ont également été appliqués de façon plus systématique dans certaines parties fortement infectées du pays, signalées par le Ministre de l'agriculture.

Les vaccinations n'étaient pas obligatoires. Elles ont été pratiquées par les vétérinaires praticiens et répétées à deux semaines d'intervalle. Le coût de ces vaccinations était à la charge du Gouvernement. Dans toutes les exploitations où des cas de fièvre aphteuse sont apparus malgré la vaccination des porcs, la politique habituelle d'abattage systématique a été appliquée.

Les résultats de ces dernières vaccinations, en particulier, sont d'interprétation difficile. On ne disposait d'aucun animal témoin et les vaccinations n'ont pas partout été faites de manière uniforme.

On ne peut donc guère faire autre chose qu'enregistrer des faits. De toute nécessité, il faudra faire preuve de prudence en dégageant des conclusions, étant donné que l'évolution de l'épizootie, par exemple dans certaines parties de la province du Brabant septentrional, montre que bien souvent les mesures de lutte de routine ont été pleinement adéquates pour juguler la maladie après son introduction initiale, sans que le recours au vaccin soit nécessaire. Tel a notamment été le cas dans les régions ayant autant de porcins par exploitation et par unité de surface que d'autres parties de la province plus gravement atteintes.

En règle générale, l'ordre de procéder à la revaccination après deux semaines signifiait que, dans une zone donnée, les vaccinations devaient être effectuées dans cet intervalle. Bien souvent, cela n'a pas été fait et, en conséquence, la campagne se poursuivait encore dans quelques régions sept ou huit semaines après le début des

opérations. Ces faits ne permettent cependant pas de conclure que ce ralentissement a atténué l'efficacité de la vaccination; il se peut en effet que, dans les zones où les opérations de vaccination ont été lentes, le taux de morbidité ait été relativement faible.

D'autre part, les renseignements à notre disposition indiquent uniquement la quantité de vaccins utilisée dans chaque commune, mais ne précisent généralement pas si le vaccin a servi pour la primo-vaccination ou la vaccination de rappel. Bien que des dispositions aient été prises pour encourager la vaccination et, par exemple, que des autorisations de transport de porcs à abattre n'aient été délivrées que pour les exploitations entièrement vaccinées, le nombre des doses de vaccin effectivement utilisées a été insuffisant dans la plupart des zones pour vacciner complètement plus de 50 à 75% des effectifs porcins.

Bien que l'on se heurte à des difficultés en essayant d'interpréter les résultats de l'emploi de ce type de vaccin, il semble que ces résultats aient été encourageants.

Dans pratiquement tous les cas, la maladie a disparu une dizaine de jours après l'administration d'une quantité suffisante de vaccin pour traiter en une seule fois 80 pour cent des porcins présents et, même dans les régions fortement atteintes, l'épizootie a été maîtrisée 4 semaines après le début des vaccinations de masse.

Les données rassemblées dans la province du Brabant septentrional entre le 11 décembre et la fin de l'épizootie dans cette partie du pays, pendant la première semaine de février, permettent de se faire une idée sur les rapports existant entre l'intervalle de vaccination et l'apparition de la maladie dans les exploitations vaccinées. Sur 246 exploitations déclarées infectées en décembre, 39 ont été vaccinées. En janvier, ces chiffres étaient de 238 et 68. On connaît la date exacte de vaccination des animaux dans 36 à 61 respectivement de ces exploitations vaccinées. De nombreux foyers ont été enregistrés 1 à 4 jours apres la vaccination. Il n'est pas impossible que la vaccination ait parfois été à l'origine de l'infection. Dans les exploitations vaccinées depuis plus de 10 jours, seuls des cas sporadiques se sont déclarés. Dans 10 de ces exploitations, la maladie a été diagnostiquée chez des porcins ayant reçu deux doses de vaccin. Ces ruptures d'immunité se sont manifestées en particulier chez des truies dont les porcelets non vaccinés avaient été infectés en premier. Des cas analogues ont été observés ultérieurement dans la province de Gueldre.

Dans la province du Limbourg, la vaccination volontaire au moyen du vaccin employé pour les bovins a été pratiquée à assez grande échelle, mais la revaccination n'a pas été faite de façon systématique. Ces vaccinations ont également progressé selon un rythme plus lent que dans les parties du pays où elles avaient été effectuées aux frais du Gouvernement. Dans plusieurs communes, la maladie a persisté et des foyers ont continué d'éclater jusqu'à 6 semaines après administration d'une quantité suffisante de vaccin en injection unique pour traiter 80 pour cent des porcins présents. Il semble donc que la vaccination ait donné des résultats moins satisfaisants qu'ailleurs.

Les renseignements dont nous disposons n'indiquent pas que le virus tend à persister chez les porcins adéquatement vaccinés, qu'ils aient été traités avec du vaccin concentré ou avec du vaccin "classique".

Les résultats obtenus avec du vaccin concentré montrent que la vaccination anti-aphteuse des porcins peut efficacement combattre la maladie à condition d'aller de pair avec l'application des mesures nécessaires de police vétérinaire. De tels succès ont été remportés lorsque tous les porcs présents dans la zone exposée à l'infection ont été immunisés sans délai. Même dans une région fortement atteinte, la maladie a disparu en une quinzaine de jours.

Le vaccin classique n'a pas été utilisé dans des conditions comparables. Il n'a été appliqué que par des vétérinaires praticiens; en règle générale, une partie seulement des porcins de chaque village ont été traités avec ce vaccin et les vaccinations

EPIZOOTIE APHTEUSE DE 1965 - 1966

P R O V I N C E

Période	Gron.	Frl.	Dr.	Ov.	Geld.	Utr.	N.H.	Z.H.	Zeel.	N.B.	Limb.	Total
3-23 oct.										1	5	6
24-30 oct.										8	2	10
31- 6 nov.										14	4	18
7-13 nov.					1					38	27	66
14-20 nov.										89	32	121
21-27 nov.					1					129	30	160
28- 4 déc.			1		6					140	21	168
5-11 déc.					29				1	150	22	202
12-18 déc.					31	1				149	25	206
19-25 déc.			1	21	52	1				107	14	196
26- 1 jan.			3	30	89	1				97	9	229
2- 8 janv.			2	32	151	3				99	18	305
9-15 janv.			2	35	282	3	1			72	17	412
16-22 janv.		1	3	33	375	6				45	9	472
23-29 janv.			3	29	251	9		1		36	19	348
30- 5 fév.			4	26	147	2	1	3		14	9	206
6-12 fév.			7	25	58	2			1	3	7	103
13-19 fév.			3	15	37					1	1	57
20-26 fév.			2	11	14	1				1	2	31
27- 5 mars			1	1	10	6						18
6-12 mars				5	8	2					1	16
13-19 mars				12	1	4						17
20-26 mars				20	1	3						24
27- 2 avr.				42	1	1						44
3-10 avr.				53								53
10-16 avr.				35								35
17-23 avr.				16	1							17
24- 1 mai				5								5
2- 8 mai												0
9-15 mai				2								2
16-22 mai				1								1
23-29 mai												0

ANNEXE 16

LA FIEVRE APHTEUSE CHEZ LE PORC. I. LA REPONSE IMMUNITAIRE DU PORC AU VIRUS APHTEUX TRAITE OU NON PAR DES PRODUITS CHIMIQUES

par P.D. McKercher et A.R. Giordano *

Introduction

Pendant un certain nombre d'années, on n'a pas accordé une grande importance à la vaccination du porc contre la fièvre aphteuse (FMD) (26). Cependant, au cours des dernières années, la tendance du virus aphteux (FMDV) particulièrement du type C à se répandre dans les effectifs porcins européens à provoqué un intérêt considérable. A l'heure actuelle, l'immunisation active du porc est généralement préconisée (11, 12, 13, 15, 16, 25, 35). Les recherches effectuées en Hollande et en Italie ont démontré que l'addition de saponine au vaccin améliorerait quelque peu la réponse immunitaire du porc, mais qu'il était nécessaire d'utiliser un vaccin quatre à dix fois plus concentré pour obtenir un résultat comparable à celui obtenu avec les bovins (32, 34). Ces observations font apparaître la nécessité d'une connaissance fondamentale de la réponse du porc au virus aphteux infectieux et non infectieux. Le présent travail a été entrepris pour comparer la réponse de porcs inoculés à l'aide de virus aphteux pleinement virulent à celle des animaux inoculés à l'aide de virus aphteux traité par des produits chimiques en association avec un adjuvant huileux ainsi que de virus traité par un produit chimique additionné de gel d'hydroxyde d'alumine (Alhydrogel) 1/.

Matériels et méthodes utilisés

Virus : Le virus de la fièvre aphteuse type C, souche 3 (FMDV,C 3) CANEFA (Comisión Asesora Nacional para la Erradicacion de la Fiebre Aftosa) obtenu à partir d'un mélange de tissu lingual bovin (3ème passage bovin) a été utilisé pour cette étude.

Le virus a été adapté au porc, au cobaye ou en culture de tissu selon l'usage qui devait en être fait. Un mélange de liquide vésiculaire obtenu à partir des coussinets plantaires infectés à été stocké pour servir d'antigène dans les réactions de double diffusion des précipitines d'Ouchterlony (19) dans le procédé d'immunoélectrophorèse (30) et dans l'épreuve de fixation du complément. Un mélange a été également fait du 6ème passage du virus C 3 en culture de tissu de rein de veau (BK) pour l'épreuve de neutralisation du virus (VN) effectuée sur souriceau non sevré (18, 31).

Cette souche adaptée à une culture de cellules rénales de hamster (BHK) a été le virus utilisé pour tout le matériel inoculé traité par des produits chimiques. Le virus cultivé sans addition de sérum de bovin au milieu a été récolté au bout de 24 heures, clarifié par centrifugation pendant 20 minutes à 2 000 tours minute à 4° centigrades et le liquide surnageant a été stocké à -40° centigrades.

Agents inactivants : A. Le Glycidaldéhyde 2/ (GDA) a été ajouté au virus produit en culture de cellule BHK à une concentration de 0,02 pour cent par la méthode de Martinsen (24). Un certain nombre de lots de virus ont été traités de cette façon et des fractions aliquotes de ces lots ont été enlevés à zéro heure, puis au 1ère, 2ème, 3ème, 4ème, 8ème, 12ème, 16ème, 24ème, 48ème, et 96ème heures.

B. L'Acétyléthylèneimine 3/ (AEI) a été ajoutée au virus en culture cellulaire BHK à une concentration de 0,05 pour cent (3, 5, 14). Les prélèvements ont été effectués à 0 heure puis aux 24ème, 48ème, 72ème et 96ème heures.

On n'a pas essayé de neutraliser les agents inactivants, on a seulement procédé au refroidissement rapide et au stockage à -40°.

---

* Plum Island Animal Disease Laboratory, Long Island, Etats-Unis.

1/ Alhydrogel: Hydroxyde d'alumine colloïdal obtenu auprès de Dansk Svovlsyre - o.g., fabrique de superphosphate Danemark (l'emploi de ce nom commercial n'engage pas la responsabilité du Département de l'agriculture américain).

2/ Glycidaldéhyde: (d'une pureté supérieure à 97 pour cent par analyse de l'époxyde et de l'acide carbonique) Shell Development Company, Emeryville (Californie).

3/ L'Acétyléthylèneimine: (AEI) à 95 pour cent de pureté, a été produite par l'Interchemical Corporation, New York, N.Y.

Adjuvants : Les adjuvants utilisés dans cette étude ont été, l'adjuvant huileux et le gel d'alumine, tel qu'il est employé par Cunliffe et Graves (10).

Méthodes d'essai : Tests d'innocuité. Les tests d'innocuité des préparations virulentes traitées par des produits chimiques ont été effectués selon les méthodes de Henderson (20) sur bouvillons de Burrows (6) et Girard et al (17) sur les porcs et de Martisen (24) sur souris et cultures cellulaires. Un lot de virus BHK, traité pendant quatre heures par le GDA, a été testé sur des porcs, des souris et en culture cellulaire seulement.

Etudes sur la virémie : souris. Des échantillons de sang additionnés d'anticoagulants (citrate de soude), prélevés du jour 1 au jour 10, ont fait l'objet de dilutions échelonnées de 10^0 à 10^{-7} dans un bouillon de phosphate de tryptose de p^H 7.4. Cinq souriceaux non sevrés de 4 à 9 jours ont reçu 0,03 ml de la dilution choisie inoculée par la voie intrapéritonéale (i.p.) (31). Le nombre de morts parmi les souriceaux a été relevé tous les jours pendant cinq jours et la dose léthale (LD 50) a été calculée par la méthode de Reed et Munch (29).

Titrages : Le titrage par voie intramusculaire (i.m.) sur le porc (2 porcs par dilution) a donné les résultats suivants pour le premier passage sur le porc du virus C 3, le sixième passage sur le porc et le virus en culture cellulaire BHK $10^{-4,5}$, 10^{-7} et $10^{-6,5}$, dose infectante (ID 50) par ml, ces résultats étant obtenus par la méthode de Reed et Munch (29). De la même façon, ces mêmes virus et en outre le virus obtenu par quatrième passage sur bovins ont été titrés sur la souris et la LD_{50} obtenue a été respectivement de $10^{-8,52}$, $10^{-9,15}$, $10^{-6,74}$ et $10^{-7,10}$ LD_{50} par ml.

Epreuves de neutralisation : Les titres d'anticorps neutralisants ont été déterminés en utilisant des tests VN avec une quantité de virus constante dans des dilutions de sérum allant du simple au quintuple.

Les titres d'anticorps ont été exprimés en dose protectrice 50 pour cent (PD_{50}), par le logarithme décimal égal à la réciproque de la dilution de sérum protégeant la moitié des souris inoculées avec 100 LD_{50} souris (18).

Les valeurs de la dose protectrice 50 pour cent sur souris, de tous les échantillons de sérum jusqu'à et y compris le 90ème jour suivant l'inoculation (DPI) ont été étudiées par l'analyse de la variation selon la méthode des moindres carrés. L'importance des différences moyennes de groupe, de jour et de l'interaction groupe-jour a été déterminée. L'analyse par ordinateur a été utilisée à cause du volume des données et des variations du nombre d'animaux dans les différents groupes, tout au long de la durée de l'expérience.

Diffusion des précipitines en gélose : Des tests de double diffusion d'Ouchterlony ont été effectuées sur bacto agar en solution à 1 pour cent dans la barbitalglycine tamponnée au p^H 7.7. (19).

Fixation du complément : L'activité complémentaire du sérum de porc a été éliminée par traitement à l'aide de formol tel qu'il est décrit par Cowan (7). Afin d'obtenir une fixation satisfaisante avec les sérums traités par le formol, du sérum de bovin normal (NBS) a été ajouté selon la méthode de Cowan (8).

L'addition de formol au sérum pour faire disparaître l'effet complémentaire a été effectuée de la façon suivante : 1 ml de sérum a été placé dans un flacon fermé par un bouchon vissé et chauffé à 56° centigrades pendant 30 minutes. A ce sérum inactivé a été ajouté 0,1 ml d'une dilution de formol à 1:72; le mélange a été maintenu à 37° centigrades pendant 45 minutes. Le ml de sérum additionné de formol a été considéré comme non dilué pour toutes les épreuves.

Animaux : Porcs. Les animaux utilisés dans cette expérimentation étaient des porcs de race Tamworth, pesant 60 à 80 livres. Pour éviter la transmission possible de l'infection dans l'effectif, six ou douze porcs ont été placés dans chacune des différentes unités d'isolement spécialement conçues et munies de dispositifs d'aération soigneusement contrôlée. Des règles très strictes ont été imposées pour assurer l'isolement des animaux, tant en ce qui concerne les procédés d'alimentation que les précautions pour entrer dans les unités et sortir de celles-ci.

Chaque porc a reçu en inoculation intramusculaire effectuée sur le côté gauche, à mi-chemin entre l'épaule et la base de l'oreille, 2 ml d'une solution comportant 1 ml du matériel virulent traité, additionné d'une quantité égale de l'adjuvant huileux ou d'alhydrogel.

Expérimentation et résultats

Epreuves d'innocuité : A. Toutes les fractions aliquotes de virus en culture cellulaire BHK traités par le GDA, ont été négatifs en matière de virus actif résiduel après deux heures, comme l'ont montré les épreuves en culture de tissu et sur souris (24). Le matériel virulent traité pendant 4 heures, qui a été utilisé dans cette expérimentation, a été éprouvé par inoculation à six porcs, trois animaux étant inoculés par voie intradermolinguale (i.d.l.) et trois par voie intramusculaire. Aucun des porcs inoculés n'a présenté les signes de la fièvre aphteuse et tous se sont montrés réceptifs à l'épreuve lors d'une inoculation effectuée 45 jours après la première inoculation. Les lots de virus en culture cellulaire BHK traités par le GDA pendant 48 et 96 heures se sont révélés non pathogènes pour les bouvillons par le test d'Henderson (20).

B. Les lots de virus en culture cellulaire BHK traités par l'AEI et prélevés après 0,24, 48, 72 et 96 heures ont été éprouvés quant à leur pouvoir infectant sur souris et culture de tissu et toutes les épreuves ont révélé l'absence de particules infectieuses après vingt-quatre heures. Le lot prélevé à la 96ème heure n'a entraîné aucun signe de fièvre aphteuse alors qu'il a été éprouvé sur bouvillons (20).

Etude de la virémie : Le virus a été isolé du sang de tous les porcs infectés expérimentalement dans les 24 heures habituellement, mais on a enregistré quelques variations individuelles. On n'a pas isolé le virus à partir du sang des porcs qui avaient reçu le matériel traité.

Porcs : Les porcs infectés expérimentalement avec le virus aphteux sont restés séparés des autres animaux d'expérience tout le long de l'expérimentation. Tous les porcs ont été examinés et leur température relevée tous les jours pendant les 14 premiers jours. Douze porcs infectés expérimentalement par le virus aphteux, 12 animaux inoculés à l'aide du virus en culture cellulaire BHK traité au GDA pendant 4 heures et additionné de l'adjuvant huileux, ainsi que 6 porcs témoins, ont fait l'objet de prélèvements de sang quotidiens pendant 10 jours, puis, une fois par semaine pendant 8 semaines, et ensuite tous les mois pendant six mois jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Les prélèvements de sang ont été effectués sur les porcs inoculés avec la préparation traitée à l'aide de l'AEI et des adjuvants, tous les jours pendant 10 jours et par la suite, les 14ème, 21ème, 28ème, 50ème et 90ème jours après l'inoculation; les prélèvements de sang ont été également effectués les 7ème et 14ème jours après l'épreuve d'immunité.

Les porcs restants, inoculés avec le virus en culture cellulaire BHK traité par le GDA pendant 48 et 96 heures et les adjuvants, ont fait l'objet de prélèvements de sang effectués les 7ème, 14ème, 21ème, 28ème, 50ème et 90ème jours après l'inoculation, ainsi que les 7ème et 14ème jours après l'épreuve d'immunité. L'immunité de 22 de ces animaux a été éprouvée par contact avec les porcs infectés de fièvre aphteuse au 90ème jour suivant l'inoculation et les 18 porcs restants au 188ème jour.

Epreuve d'immunité par contact : L'immunité de tous les porcs d'expérience vivants aux 90ème, 178ème et 188ème jours après l'inoculation a été déterminée par leur résistance à l'infection après contact avec des porcs infectés par le virus aphteux homologue.

Ces porcs ont été examinés et leurs températures relevées chaque jour pendant 14 jours. Leur sang a été prélevé les 7ème et 14ème jours après infection et les animaux ont été sacrifiés et autopsiés le 14ème jour.

Tout au long de cette étude, par commodité, les sérums prélevés après l'inoculation seront désignés par les termes de sérum DPI tandis que les sérums, prélevés sur les porcs mis en contact d'animaux infectés de fièvre aphteuse après avoir été inoculés au préalable, seront désignés par les termes de sérum DPE.

Cent trente deux porcs au total ont fait l'objet de cette expérimentation (Tableau 1); ils se répartissent de la façon suivante :

A. Trente animaux inoculés avec le liquide vésiculaire provenant de virus après passage sur le porc ont eu une infection sévère et ont présenté des lésions dans les 24 à 36 heures. Seize d'entre eux sont morts dont douze dans les cinq jours suivant l'inoculation. A l'autopsie le myocarde présentait des lésions importantes. La température de tous les animaux s'est élevée à 106° F ou davantage dans les 24 heures suivant l'inoculation; les animaux avaient des difficultés à tenir debout, à se déplacer et à manger.

Douze porcs, guéris, étaient toujours vivants à la fin de l'expérimentation. Huit ont été éprouvés par contact avec des animaux infectés du 178ème au 188ème DPI et quatre d'entre eux se sont réinfectés. Un porc a été tué par l'autre dans les quarante huit heures suivant leur mise en contact. Quatre porcs ont été éprouvés de la même façon au 90ème DPI et deux d'entre eux se sont infectés. Ainsi, six porcs sur douze se sont réinfectés comme l'ont prouvé les lésions vésiculaires apparues sur le groin et un, deux ou trois pieds.

B. Le lot des 52 animaux inoculés avec le virus traité par le GDA et associé soit à l'adjuvant huileux, soit à l'alhydrogel, était composé de la façon suivante : 12 animaux avec le virus traité par le GDA pendant 4 heures et additionné de proportions égales d'adjuvant huileux, 5 avec le virus traité par le GDA, 48 heures et l'adjuvant huileux; 5 avec le virus traité par le GDA, 48 heures et l'alhydrogel; 15 avec le virus traité par le GDA, 96 heures et l'adjuvant huileux; 15 avec le virus traité par GDA, 96 heures et l'alhydrogel.

Le traitement seul, pendant 48 heures ou 96 heures, n'a pas eu, apparemment, d'influence notable sur le taux des anticorps neutralisants et ainsi c'est sur la base de l'adjuvant seulement que les porcs ont été séparés. Les 40 porcs inoculés avec le virus traité pendant 48 et 96 heures par le GDA et combiné aux deux adjuvants, ont été divisés en 2 groupes et éprouvés par contact avec des porcs infectés de fièvre aphteuse, respectivement aux 90ème et 188ème DPI. Le premier groupe, exposé à l'infection au 90ème DPI, se composait de 22 porcs, constitués de deux groupes de 11 chacun, se différenciant par la nature de l'adjuvant utilisé. Onze des porcs inoculés avec le virus traité, combiné à l'alhydrogel, se sont infectés et ont présenté des lésions vésiculaires sur le groin, la langue, les lèvres et les quatre pieds. Quatre des onze animaux inoculés avec le virus traité combiné à l'adjuvant huileux ont présenté les signes de la fièvre aphteuse, les manifestations en étant très atténuées, une vésicule sur un pied, des vésicules sur deux pieds postérieurs et pour les deux autres porcs, une lésion suspecte sur un pied seulement.

Les résultats ont été toutefois complètement différents lorsque les 18 porcs restants ont été exposés à l'infection au 188ème DPI; sept parmi les 9 porcs inoculés avec le virus traité combiné à l'adjuvant huileux, ont été considérés comme infectés. Un porc seulement a présenté des vésicules sur les quatre pieds, les autres ont eu une lésion bénigne sur un ou deux pieds seulement.

En comparaison, les porcs inoculés avec le virus traité combiné à l'alhydrogel ont, à l'exception d'un animal, présenté des lésions vésiculaires sur le groin, la langue, les lèvres et les quatre pieds.

C. Dix-sept animaux inoculés avec le virus traité par l'AEI, 96 heures et combiné, soit à l'adjuvant huileux, soit à l'alhydrogel, dont 8 avec le virus traité et l'adjuvant huileux et 9 avec le virus traité à l'alhydrogel.

Seize parmi les 17 porcs inoculés avec le virus traité par l'AEI, 96 heures et les adjuvants, étaient vivants au 90ème DPI. Aucun des 8 porcs inoculés avec le virus traité par l'AEI et l'adjuvant huileux n'a présenté de signes cliniques de la fièvre aphteuse, lors de l'épreuve, par contact, avec des porcs infectés. Les 8 porcs inoculés avec le virus traité de façon semblable et l'alhydrogel, se sont infectés et ont présenté des lésions vésiculaires étendues sur le groin, la langue, la bouche et les quatre pieds.

D. Vingt trois porcs non inoculés ont été utilisés comme témoins dans cette expérimentation, 16 dans le groupe B et 7 dans le groupe C. Les 23 témoins se sont infectés lorsqu'ils ont été mis au contact de porcs aphteux, les lésions aphteuses étant généralisées (lésions vésiculaires importantes sur le groin, la langue, la bouche et les quatre pieds).

E. Dix porcs ont été infectés expérimentalement par l'épreuve de contact avec des animaux aphteux. Ces animaux ont été choisis en fonction de leur âge et de leur poids qui étaient comparables à ceux des porcs avec lesquels ils ont été mis en contact. Après 24 à 48 heures, ces dix porcs ont présenté des lésions vésiculaires sur le groin, la langue, la bouche et les 4 pieds.

Quatre des porcs témoins et 3 des animaux inoculés avec le virus traité et l'alhydrogel sont morts des suites de l'infection par la fièvre aphteuse au cours des épreuves de contagion.

<u>Epreuves de neutralisation</u> : Les anticorps ont pu être mis en évidence sur les porcs infectés expérimentalement, dès le 3ème DPI, mais plus généralement à partir du 4ème. Le titre d'anticorps le plus élevé a généralement été atteint au 9ème ou au 10ème DPI et, vers le 28ème jour, le titre d'anticorps avait atteint un plateau qui est resté relativement constant pendant la durée de l'expérience (Fig. 1a). Lorsque ces porcs ont été exposés à l'infection par le virus homologue, on a noté une augmentation des anticorps aux 7ème et 14ème DPE. Chez les porcs qui se sont réinfectés après contact avec le virus homologue, à la suite de la guérison de la maladie expérimentale, on a constaté une augmentation plus importante du titre d'anticorps.

Pour les porcs inoculés avec le virus traité par le GDA pendant 4 heures, combiné à l'adjuvant huileux, les anticorps ont été habituellement détectés aux 6ème ou 7ème DPI, mais, leur titre n'a pas atteint le maximum avant le 21ème à 28ème DPI, et dans quelques cas, plus tard encore. Le taux des anticorps a diminué légèrement, mais est resté relativement constant pendant la durée de l'expérimentation (Fig. 1b). Dans toutes les préparations de virus traitées et combinées avec l'adjuvant huileux on a fait des observations similaires et le titre d'anticorps atteint n'a pas présenté de différences notables (Fig. 2 à 3a).

On a constaté que les porcs inoculés avec le virus traité à l'alhydrogel présentaient très rapidement des anticorps apparaissant le 5ème ou le 6ème DPI pour atteindre un maximum avant le 14ème jour, diminuant jusqu'à un titre presque indécelable aux environs du 21ème DPI (Fig. 2b, 3b). Lorsque tous ces groupes d'animaux ont été mis au contact de porcs infectés par un virus homologue, le taux d'anticorps a considérablement augmenté les 7ème et 14ème DPE.

Il n'a pa pu être décelé d'anticorps sur les animaux témoins utilisés dans toutes ces expériences avant l'inoculation ou infection par contact.

Les valeurs de groupe PD_{50}, ont présenté des différences notables ($p < .01$). Les porcs guéris de l'infection aphteuse ont eu des titres d'anticorps beaucoup plus élevés que ceux inoculés avec le virus traité et l'adjuvant huileux ou l'alhydrogel ($p < .01$). Les porcs inoculés avec le virus traité et l'adjuvant huileux ont eu des titres notablement plus élevés que les animaux ayant reçu le virus traité et l'alhydrogel ($p < .01$) (Fig. 5). Le taux des anticorps a varié pour tous les groupes avec le temps, après la vaccination. Une interaction significative du groupe avec le temps (la réponse immunitaire du groupe dans le temps) montre une différence fondamentale en ce qui concerne les anticorps selon les produits utilisés pour traiter le virus (Fig. 4).

Test de précipitation en géloze : Les anticorps précipitants ont été mis en évidence sur des sérums de porcs infectés expérimentalement à l'aide du virus aphteux du 7ème au 178ème à 188ème DPI. Les sérums prélevés au 7ème et 14ème DPE des animaux à la fièvre aphteuse ont produit des réactions de précipitation très élevées. Cependant, des réactions plus fortes ont été provoquées par les sérums des porcs qui se sont infectés lors de l'épreuve de contact.

Avec les sérums de porcs inoculés avec le virus traité par le GDA et l'AEI combiné avec l'adjuvant huileux, les anneaux de précipitine ne se sont pas formés généralement avant le 21ème DPI, ils sont devenus plus marqués aux 28ème et 50ème DPI et se sont atténués au 178ème DPI. La précipitation produite par les sérums recueillis aux 7ème et 14ème DPE a été plus intense.

Cependant, les sérums des porcs inoculés avec le virus traité par le GDA et l'AEI combiné avec l'alhydrogel,n'ont pas provoqué d'anticorps en quantité suffisante pour être mis en évidence jusqu'aux 7ème et 14ème DPE. Dans aucun cas, les sérums des porcs témoins n'ont produit de réactions de précipitation avant les 7ème et 14ème jours suivant, soit l'inoculation, soit la mise en contact d'animaux infectés de fièvre aphteuse.

Des bandes doubles de précipitine ont été observées avec plusieurs des échantillons de sérum, dénotant la présence de deux composants viraux nommément, les particules $23\text{-}m_u$ et $7\text{-}m_u$ décrites par Brown et Crick (4).

Réaction de fixation du complément : Les titres sérologiques de fixation du complément sont exprimés par la réciproque de la dilution de sérum donnant 50 pour cent de lyse. Les anticorps fixant le complément ont pu être mis en évidence dans les sérums des porcs guéris de l'infection expérimentale par la fièvre aphteuse, au 14ème jour généralement. La propriété de fixation du complément a atteint son maximum entre les 21ème et 28ème DPI. Les variations dans les titres CF des porcs pris individuellement ont été considérables, s'étendant habituellement entre 160 et 240. A six mois il était encore possible de trouver une quantité appréciable d'anticorps CG (Fig. 1a). Quatorze jours après l'épreuve de mise au contact avec des porcs infectés de fièvre aphteuse, le titre d'anticorps CF a augmenté de 2 à 5 fois, le taux le plus élevé se rencontrant chez les animaux qui se sont réinfectés.

Le moment auquel sont apparus les anticorps CF a été très variable, les sérums provenant de porcs inoculés avec les virus traités par le GDA et l'AEI combinés avec l'adjuvant huileux. Les anticorps sont apparus le 21ème jour dans les sérums provenant de porcs inoculés avec le virus traité par le GDA 4 heures et l'adjuvant huileux; ils ont augmenté jusqu'au 50ème jour et sont restés à peu près au même taux au cours de la période restante de six mois. Les titres d'anticorps CF étaient compris entre 30 et 120; ils ont été généralement moindres que ceux obtenus avec les sérums de porcs infectés expérimentalement par la fièvre aphteuse (Fig. 1b).

Les sérums de porcs inoculés avec le virus traité par l'AEI et l'adjuvant huileux ont eu des titres d'anticorps CF très proches du 90ème DPI (Fig. 2a). Avec le virus traité par le GDA 48 et 96 heures et l'adjuvant huileux, on a constaté un titre CF plus bas au 90ème DPI, allant de 0 à 80 (Fig.3a), et au bout de six mois parmi les porcs restants, très peu d'entre eux avaient un taux d'anticorps CF décelable. Dans les sérums de porcs inoculés avec le virus traité et l'alhydrogel, il n'existait pas d'anticorps CF décelable (Fig. 2b, 3b). Chez la plupart des porcs, il y eu une augmentation substantielle du titre des anticorps au 14ème DPE.

Discussion

Les traitements chimiques du virus semblent priver celui-ci de son pouvoir infectant, comme l'indiquent les épreuves d'innocuité effectuées. L'inoculation de langue de bouvillon à un certain nombre de points(20) paraît être la méthode la plus sensible pour déceler le virus, la méthode la plus fidèle étant ensuite l'inoculation des porcs au niveau du coussinet plantaire (6,17). La méthode consistant à éprouver l'innocuité des virus traités sur souris et culture de tissus n'est pas suffisamment sensible comparée aux épreuves effectuées sur bouvillons ou sur porcs. L'absence de virus actif ne peut cependant pas être présentement prouvée (20). Le matériel traité par le GDA 48 heures s'est révélé non pathogène lors de l'épreuve sur bouvillons. Le virus traité par le GDA 4 heures qui a été utilisé dans cette expérimentation, a été éprouvé du point de vue de son innocuité en culture de tissus, sur souriceaux non sevrés et sur porcs, mais ne l'a pas été sur bouvillons. On aurait pu imaginer qu'il contenait du virus capable de se développer, bien qu'aucun des animaux d'expérience inoculés avec ce matériel n'ait présenté de virémie. Brown et Crick (4), ont indiqué que le virus en culture cellulaire BHK, traité avec 0,05 pour cent d'AEI, était inactivé au bout de 12 heures, mais non de 8 heures.

Le traitement du virus en culture cellulaire BHK par l'AEI 96 heures, capable d'assurer l'innocuité a été choisi, non sur la base de la certitude d'inactivation, mais pour tenter de déterminer si le contact du virus avec l'AEI pendant ce laps de temps nuirait à la fraction protéique du virus affectant ainsi son pouvoir antigénique ou peut-être même changerait les caractéristiques des anticorps produits. On a signalé que le virus peut être traité par le formol pendant une durée de 144 heures sans que se produisent de tels effets (5).

La mise au contact de porcs infectés de fièvre aphteuse a été employée pour déterminer le degré d'immunité des porcs utilisés dans la présente expérimentation, parce que cette méthode se rapproche le plus des conditions naturelles d'infection aphteuse. Nathans (27) était également d'avis que cette méthode était la plus sévère et la plus pratique pour déterminer l'état d'immunité des animaux à éprouver.

Il est significatif que les porcs guéris de l'infection expérimentale se sont montrés réceptifs, dans certaines conditions, lors de l'épreuve d'infection avec un virus homologue. Dans les conditions de cette épreuve, et en accord avec les travaux d'autres auteurs (1, 25, 27), les porcs inoculés avec le virus traité, combiné avec un adjuvant huileux, apparaissent plus résistants lors de leur mise en contact avec le virus homologue, que les animaux guéris de fièvre aphteuse. Bien qu'elle ne soit pas longue, la durée de l'immunité apparaît comparable à celle obtenue par les chercheurs européens utilisant la saponique et un grand nombre de doses bovines du virus (2, 22, 27, 32, 34). Avec le virus du type C multiplié en cultures cellulaires BK ou BHK 21, Bengelsdorff et Schneider (2) ont élaboré un vaccin adsorbé efficace en utilisant 0,3 pour cent de saponine. Ils ont soutenu que l'addition de saponine augmentait la valeur antigénique du vaccin aussi bien que la durée de l'immunité conférée. Leurs conclusions sont conformes à celles de Nathans (27) et des auteurs utilisant des virus inactivés ou traités combinés à des adjuvants. Les doses utilisées par Bengelsdorff et Schneider (2) ont été de 5 ml, alors que dans la présente expérience elles étaient de 2 ml (1 ml de virus traité plus 1 ml d'adjuvant). La mise au contact de porcs infectés a eu lieu entre le 51ème et le 59ème DPI dans l'expérience des auteurs précités, alors que dans la présente elle a été effectuée au 90ème, 178ème. 179ème et 188ème DPI. Ubertini et al (32) considèrent qu'une "dose bovine" est constituée par un vaccin monovalent composé de 5 ml de virus multiplié sur cellule BK et ayant un titre minimum de 10^{-7} pour 1 ml. La dose minimum utilisée par Ubertini et al (32) était de 4 doses bovines ou 20 ml. La dise de 1 ml de virus en culture cellulaire BHK, utilisée dans la présente étude, représentait 7,10 doses LD_{50} souris,et une dose infectante de culture de tissu (TCID 50) en couches monocellulaires BK de 10^{-7} et était basée sur les résultats de Brown et al (5).

Les travaux de Cunliffe (9) concluant à la possibilité pour les porcs guéris de fièvre aphteuse, de se réinfecter par un virus homologue, sont confirmés. L'observation qu'il ne doit pas y avoir de corrélation décisive entre les taux d'anticorps déterminé par l'épreuve de neutralisation du virus et la résistance à l'infection confirme celle faite par Van Bekkum et al (34) ainsi que Nathans(27). En confrontant les travaux des chercheurs européens (22, 32, 34), dont les résultats ont été en grande partie basés sur le dosage, il apparaît qu'une dose du vaccin, renforcé avec l'adjuvant huileux, a provoqué un effet semblable à celui observé chez les porcs ayant reçu un vaccin contenant au moins 30 doses bovines. Ceci est en accord avec les études de Kabat et al (21) qui ont trouvé qu'une injection de substance cérébrale avec adjuvant était aussi efficace que 30 à 100 injections d'une suspension identique sans adjuvant. Les résultats obtenus dans la présente étude utilisant un adjuvant et la voie intramusculaire pour l'inoculation, confirment ceux de Leskovitz et Waksman (23). Cunliffe et Graves (10), comparant la préparation d'aluminium colloïdal (gel) et l'adjuvant de Freund incomplet ont trouvé que l'emploi d'un adjuvant huileux était plus efficace, tant comme stimulant antigénique que comme moyen d'obtenir des anticorps persistants. Alors que les opinions des chercheurs sont très différentes en ce qui concerne l'action spécifique des adjuvants, la plupart d'entre eux estiment qu'ils ont pour effet de rehausser la valeur antigénique.

Uchitel et Khasman (33) ont conclu qu'il y avait des raisons de supposer que l'action des stimulants non spécifiques sur la formation d'anticorps était liée à leur aptitude à stimuler la synthèse protéique chez l'animal, jusqu'à un stade de formation des anticorps.

La production d'anticorps chez le porc a été analysée par l'épreuve de neutralisation du virus sur souriceau non sevré, le test de diffusion des précipitines en gélose et le test de fixation du complément. Le test de neutralisation du virus s'est révélé le plus sensible pour la détection des anticorps. Le test de diffusion des précipitines en gélose, bien que relativement peu sensible, s'est révélé très utile et très rapide pour les comparaisons initiales des taux d'anticorps. L'épreuve CF, telle qu'elle a été utilisée dans cette étude, a été relativement peu sensible, mais utile pour la comparaison quantitative des taux d'anticorps produits à la suite des différentes inoculations pratiquées. Des variations considérables dans le taux des anticorps CF sont apparus selon les animaux.

Le caractère marquant du faible titre d'anticorps et de la disparition précoce des anticorps sur les porcs inoculés avec le virus traités et l'alhydrogel est très probablement lié à la masse extrêmement faible d'antigène viral et non à l'inefficacité de l'alhydrogel comme adjuvant. Ce fait démontre cependant que, dans ces conditions, l'augmentation de la production d'anticorps est considérablement plus élevée avec l'adjuvant huileux. Les auteurs pensent que l'administration d'une quantité plus grande d'antigène, combinée avec un adjuvant huileux, entraînerait une réaction immunitaire et une résistance à l'infection plus satisfaisante. Cette méthode serait préférable à celle reposant sur des inoculations répétées deux fois ou plus (22, 32, 34). Une immunité d'une durée de six mois serait pratiquement satisfaisante, étant donné que, dans ce laps de temps, la plupart des porcs, à l'exception des reproducteurs, sont prêts pour la vente et qu'une immunité de plus longue durée ne serait pas nécessaire. Le danger persistant de la fièvre aphteuse pour les porcs d'un certain nombre de régions européennes, reste une menace constante pour le cheptel. Etant donné que l'emploi d'aucun vaccin antiaphteux vivant n'a été autorisé en Europe, il apparaît utile de disposer d'un produit traité chimiquement ou inactivé qui stimulerait la synthèse des anticorps à un point tel que l'animal vacciné résisterait à l'infection.

Résumé

Les sérums de porcs inoculés avec le virus aphteux traité par un produit chimique et associé avec un adjuvant huileux ont présenté un taux d'anticorps persistant et les porcs ont résisté à l'épreuve de mise au contact avec des porcs infectés de fièvre aphteuse, pendant au moins 90 jours. Le taux d'anticorps a été notablement plus élevé chez les animaux inoculés avec le virus traité et l'adjuvant huileux que chez ceux inoculés avec le virus traité et l'hydroxyde d'aluminium, ainsi que l'indique l'analyse de la variation de la valeur de la dose protectrice souris (PD_{50}). Les porcs guéris à la suite de l'infection expérimentale par la fièvre aphteuse, peuvent être réinfectés par le virus homologue.

Remerciements

MM. W. Dorosky, J. Card, N. Shuot, F. Lawson et Mme Ethel Appelt ont droit à la reconnaissance des auteurs pour le concours technique excellent qu'ils ont apporté. Le glycidaldéide et l'acétyléthylèneimine ont été gracieusement fournis par le Dr J.S. Martinsen et le Dr O.N. Fellowes. Nous remercions le Dr R.P. Lehmann, biométricien, Livestock Research Staff, Biometrical Services Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, pour l'analyse statistique des informations recueillies.

Bibliographie

1. Armbruster, O., H. G. Garbe, W. Pilz, et O.E. Schweckendiek : Vet.-med. Nachr., No 2, 75 (1960).

2. Bengelsdorff, H.J., et B.Schneider : Bull. Off. internat. Epizoot. 61, 1185 (1964).

3. Brown, F., et J.Crick : Virology 5, 133 (1958).

4. Brown,F., et J.Crick : J. Immunol. 82, 444 (1959).

5. Brown, F., N.St.G.Hyslop, J.Crick, et A.W.Morrow : J.Hyg. 61. 337 (1963).

6. Burrows, R.: Report Presented to the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Report of Standing Technical Committee, Pirbright, United Kingdom (1963).

7. Cowan, K.M. : J.Immunol. 86, 465 (1960).

8. Cowan, K.M. : Am.J.Vet. Res. 24, 756 (1963).

9. Cunliffe, H.R. : Canad. J. Comp. Med. 26, 182 (1962).

10. Cunliffe, H.R. : et J.H. Graves : Canad. J. Comp. Med. 27, 193 (1963).

11. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, (1962).

12. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Desease, (1963).

13. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, (1964).

14. Fellowes, O.N. : J.Immunol. 88, 488 (1962).

15. Fogedby, E. : Report of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Rome, Italy (1963).

16. Geiger, W. : et B.Otte : Mon. hefte Tierheilk. 10, 35 (1958).

17. Girard, H.C., U.Charutamara, P.Supavilai, P.Smitinondana,S.Punya-Upaphat, et T.Chandrakeo : Bull. Off. internat. Epizoot. 59, 1081 (1963).

18. Graves, J.H. :J.Immunol. 91, 251 (1963).

19. Graves, J.H. , K.M.Cowan, et R.Trautman : J.Immunol. 92, 501 (1964).

20. Henderson, W.M. : J. Hyg. 50, 195 (1952).

21. Kabat, E.A., A.Wolf, et A.E.Bezer : J.Exptl. Med. 85, 117 (1947).

22. Kubin, G. : Appendix II, European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Report of Standing Technical Committee, Pirbright, United Kingdom, (1963).

23. Leskowitz, S.,et B.H. Waksman : J.Immunol. 84, 58 (1960).

24. Martinsen, J.S. : Am. J.Vet. Res. 25, 1417 (1964).

25. Michelsen, E. : Arch. fur Exp. Vet. 15, 317 (1961).

26. Möhlmann, A. : Exp. Vet. Med. 2, 79 (1950).

27. Nathans, I.: Centraal Diergeneeskundig Instituut, Amsterdam, Holland, Doctorate Thesis (1965).

28. Polatnick, J., et H.L. Bachrach : Appl. Microbiol. 12, 368 (1964).

29. Reed, L.J., et H. Muench : Am. J. Hyg. 27, 493 (1938).

30. Scheidegger, J.J. : Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol. 7, 103 (1955).

31. Skinner, H.H. : XVth. Inter. Vet. Cong. IB, 45, 3 (1953).

32. Ubertini, B., L.Nardelli, S.Barei, G.L.Gualandi, G.F.Panina, et C.Bagini : Bull. Off. internat. Epizoot. 61, 1311 (1964).

33. Uchitel, I.Ya., et E.L.Khasman : J.Immunol. 94, 492 (1965).

34. van Bekkum, J.G., S.Frenkel, et I.Nathans: Tijdschr. V.Diergeeneesk.25, 1936 (1963).

35. Vittoz, R. : Rapport XXXIII Session générale du Comité de l'OIE, Paris, France,(1965).

Légendes

Fig. 1a. - Réaction typique représentant le titre d'anticorps neutralisants et fixant le complément du groupe de porcs infectés expérimentalement avec le virus aphteux C3.

Fig. 1b. - Réaction typique représentant le titre d'anticorps neutralisants et fixant le complément du groupe de porcs inoculés avec le virus obtenu en culture cellulaire BHK, traité 4 heures par le GDA et l'adjuvant huileux.

Fig. 2a. - Réaction typique représentant le titre d'anticorps neutralisants et fixant le complément du groupe de porcs inoculés avec le virus obtenu en culture cellulaire BHK traité 96 heures par l'AEI et l'adjuvant huileux.

Fig. 2b. - Réaction typique représentant le titre d'anticorps neutralisants et fixant le complément du groupe de porcs inoculés avec le virus obtenu en culture cellulaire BHK traité 96 heures par l'AEI et l'alhydrogel.

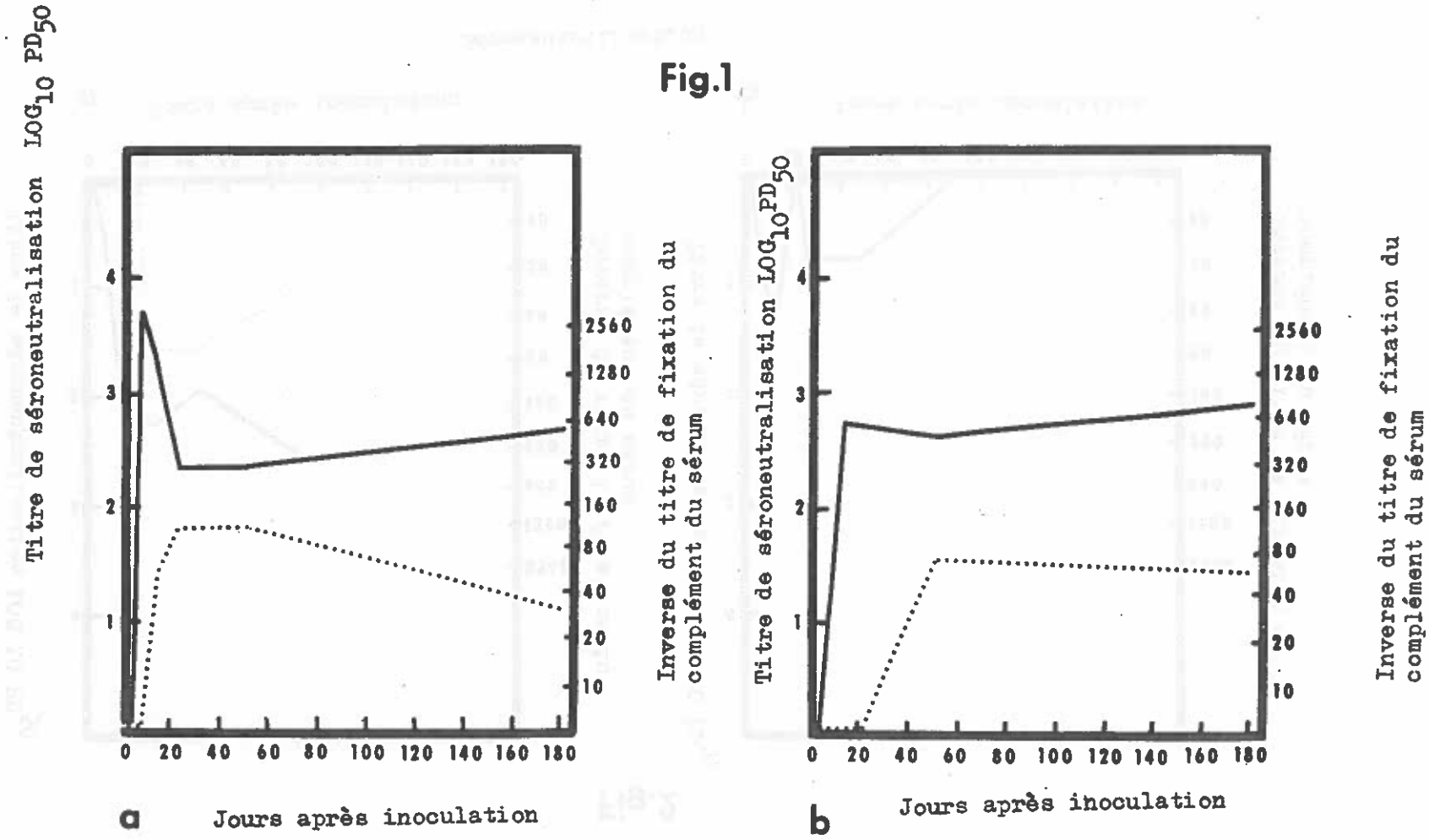
Fig. 3a. - Réaction typique représentant le titre d'anticorps neutralisants et fixant le complément du groupe de porcs inoculés avec le virus obtenu en culture cellulaire GDA traité 96 heures par l'AEI et l'adjuvant huileux.

Fig. 3b. - Réaction typique représentant le titre d'anticorps neutralisants et fixant le complément du groupe de porcs inoculés avec le virus obtenu en culture cellulaire GDA traité 96 heures par l'AEI et l'alhydrogel.

Fig. 4. - Courbes des valeurs moyennes de neutralisation souris PD obtenues à partir des sérums des différents groupes de porcs d'expérience indiquant les différences parmi ces groupes.

Fig. 5. - Courbes des valeurs de groupe moyennes de neutralisation souris PD_{50} obtenues à partir des sérums des différents groupes de porcs d'expérience indiquant les trois principaux groupes dans lesquels ces valeurs tombent et les différences parmi ces groupes.

Fig.1



Séroneutralisation

Titre de fixation du complément du sérum

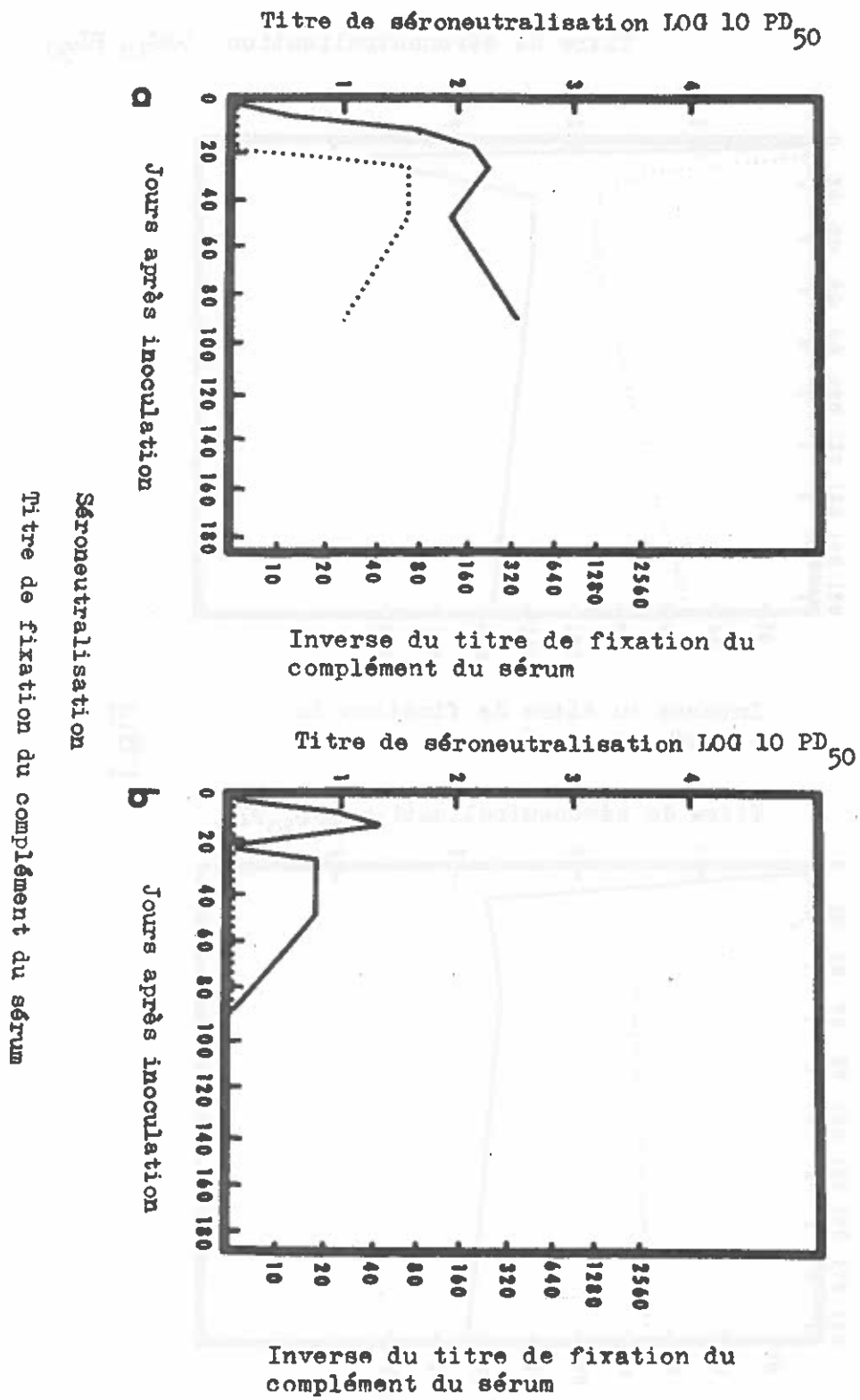


Fig.2

Séroneutralisation

Titre de fixation du complément du sérum

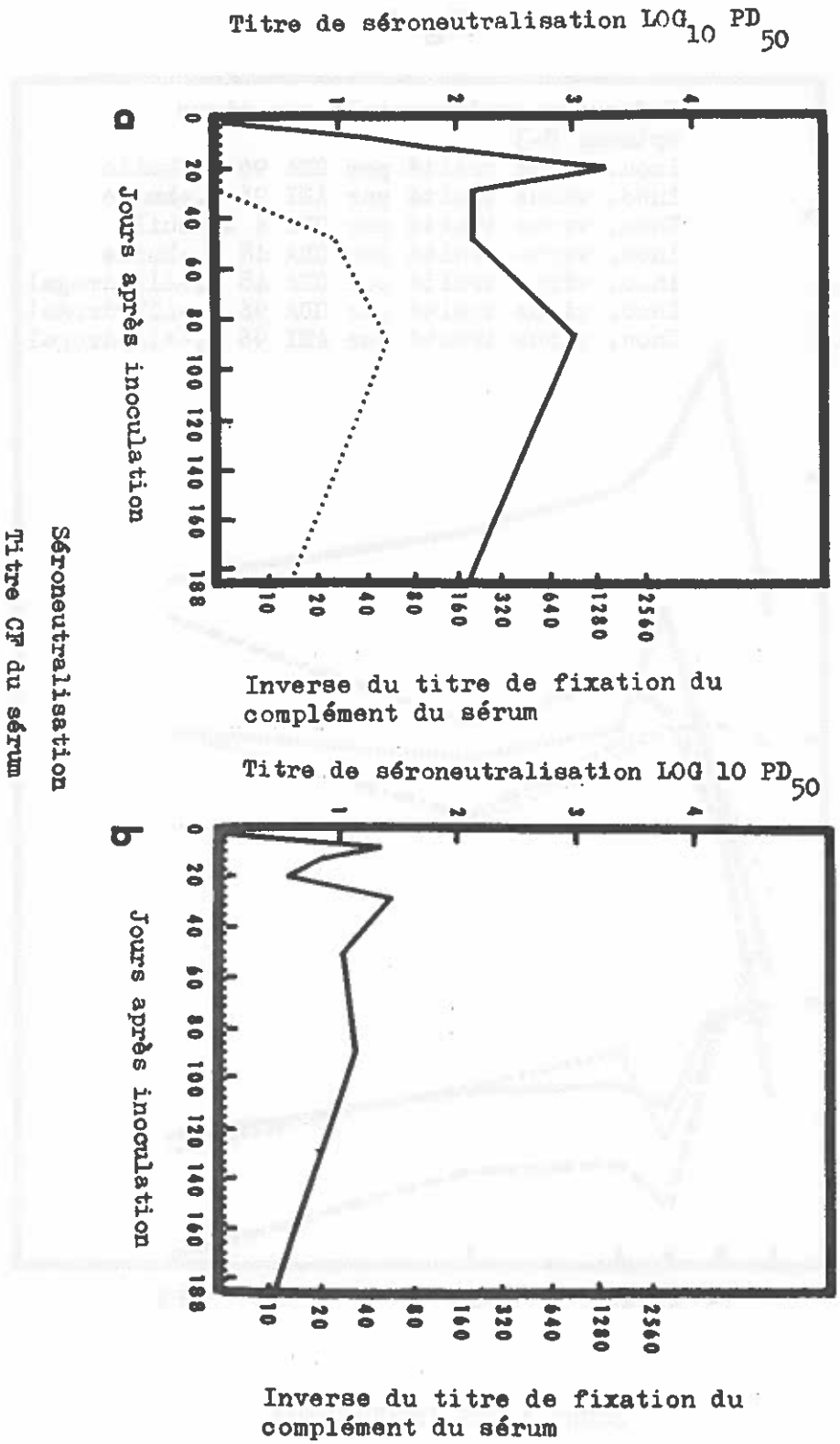

Titre de séroneutralisation LOG10 PD50
a
Jours après inoculation
Séroneutralisation
Titre CF du sérum
Inverse du titre de fixation du complément du sérum
Titre de séroneutralisation LOG 10 PD50
b
Jours après inoculation
Inverse du titre de fixation du complément du sérum

Fig.3

Fig.4

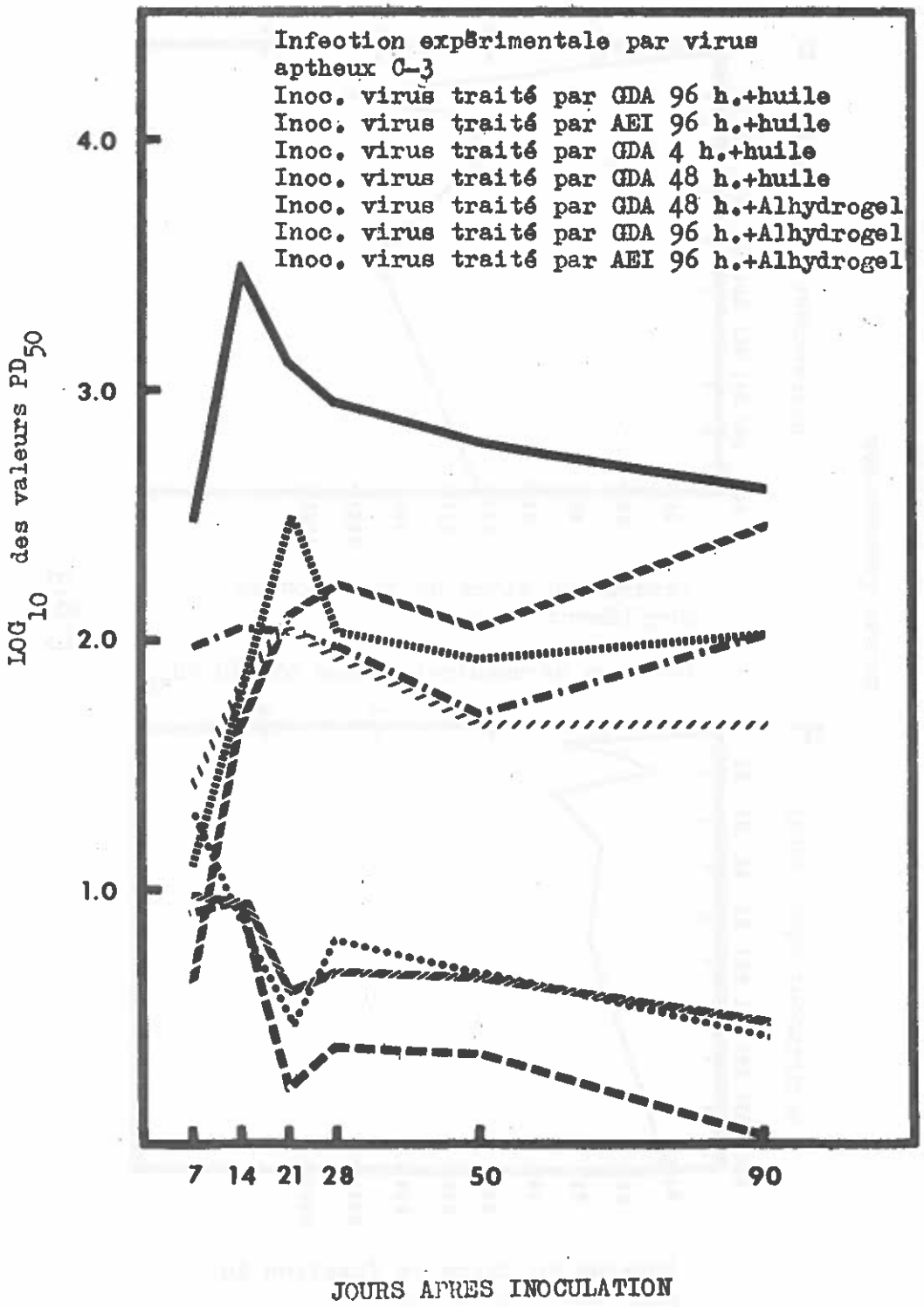
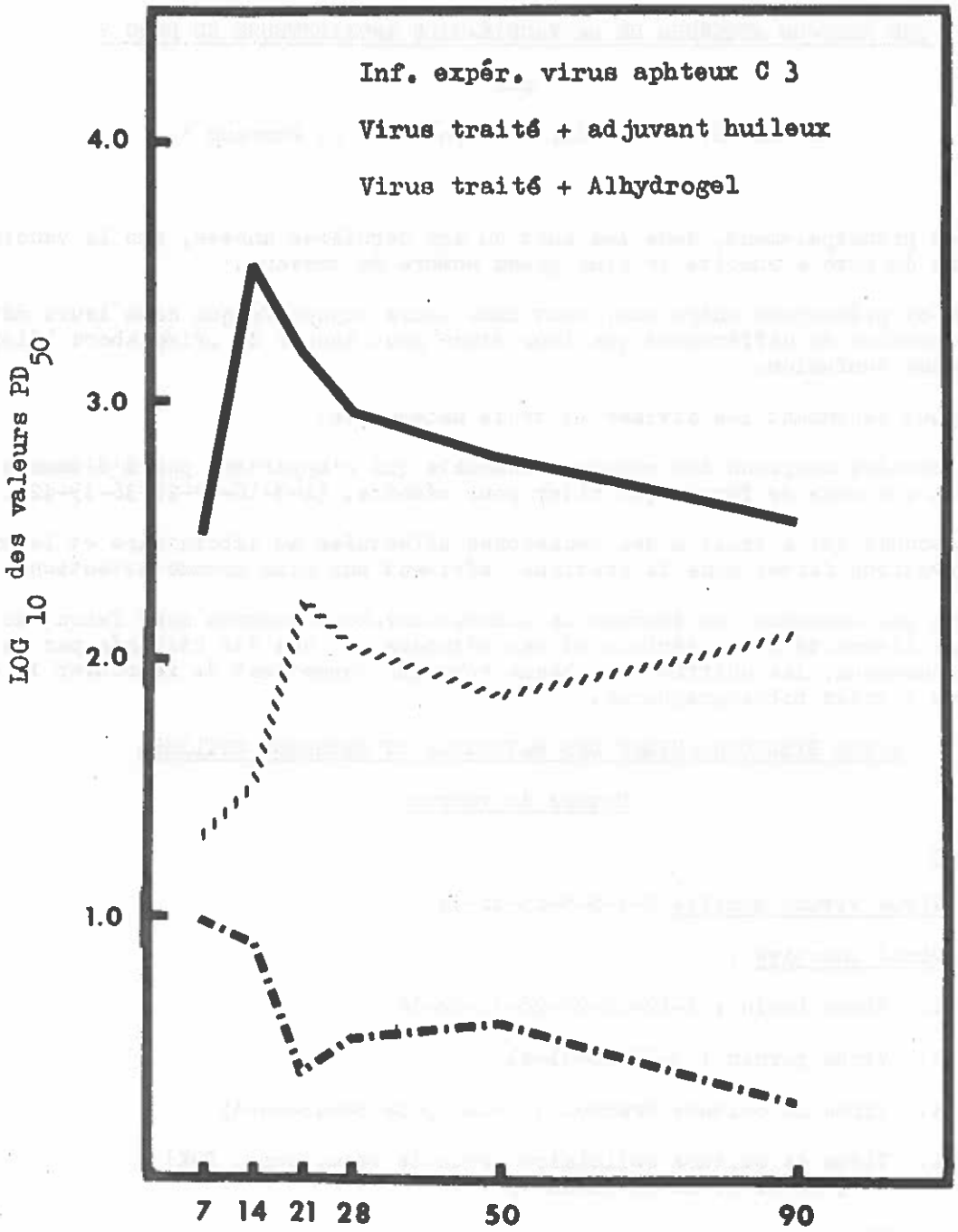

Infection expérimentale par virus aptheux C-3
Inoc. virus traité par GDA 96 h.+huile
Inoc. virus traité par AEI 96 h.+huile
Inoc. virus traité par GDA 4 h.+huile
Inoc. virus traité par GDA 48 h.+huile
Inoc. virus traité par GDA 48 h.+Alhydrogel
Inoc. virus traité par GDA 96 h.+Alhydrogel
Inoc. virus traité par AEI 96 h.+Alhydrogel
LOG10 des valeurs PD50
4.0
3.0
2.0
1.0
7
14
21
28
50
90
JOURS APRES INOCULATION

Fig.5



JOURS APRES INOCULATION

ANNEXE 17

QUE PEUT-ON ATTENDRE DE LA VACCINATION ANTIAPHTEUSE DU PORC ?

par

F. Lucam, M. Fedida, G. Dannacher, J. Perraud *

C'est principalement, dans les huit ou dix dernières années, que la vaccination antiaphteuse du porc a suscité le plus grand nombre de travaux.

Ceux-ci présentent entre eux, tant dans leurs objectifs que dans leurs méthodes, un si grand nombre de différences que leur étude peut donner de prime abord l'impression d'une certaine confusion.

On peut cependant les diviser en trois catégories.

La première comprend des revues d'ensemble qui n'apportent pas d'éléments originaux et que nous ne ferons que citer pour mémoire. (1-8-16-19-20-36-39-42).

La seconde qui a trait à des recherches effectuées au laboratoire et la troisième, à des observations faites dans la pratique, méritent une plus grande attention.

En ce qui concerne les travaux de laboratoire, nous pouvons nous faire une idée de l'extrême diversité des matériels et des méthodes qui ont été utilisés par la classification ci-dessous, les chiffres de chaque rubrique permettent de retrouver le ou les auteurs dans l'index bibliographique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES MATERIELS ET METHODES UTILISES

Nature du vaccin

A. Le virus

a) Virus vivant modifié 2-3-6-9-13-16-39

b) Virus inactivé :

1. Virus bovin : 3-12-15-27-28-31-32-36
2. Virus porcin : 3-12-28-31-41
3. Virus de culture Frenkel : 3-14-23-32-34-43-44-45
4. Virus de culture cellulaire (rein de veau, porc, BHK) : 5-10-11-17-22-35-38-41-43
5. Virus de mélange porcin et bovin : 12

---

* Laboratoire de virologie animale, Lyon, France.

B. Les autres composants du vaccin

a) Agents inactivants

1. agents chimiques
Formol : 2-3-10-11-14-17-22-23-30-31-32-34-35-38-40-43-44-45
Hydroxylamine : 3
Quinosol : 15
Salicylate de sodium : 3
Acétyléthylimine : 34
Cristal violet : 33

2. agents physiques
Ultra-violet : 32-45
Chaleur : 2-10-32-33

b) Adjuvants

1. Alumine : 3-10-14-17-23-27-30-31-32-34-35-38-40-43-44-45

2. Saponine : 5-14-17

3. Divers - huile : 3
substances émulsifiantes : 27-34

C. Valences vaccinales

a) Vaccins monovalents

- O : 9-12-22-31-41-43
- A : 2-9-16-28-40
- C : 3-5-6-9-12-17-21-32-34-38-43-44-45
- Asia : 13-14
- SAT 3 : 9

b) Vaccins bivalents OA : 12-30-41

c) Vaccins trivalents OAC : 10-11-23

La vaccination

A. Doses : 0,1 à 30 ml : variable d'un auteur à l'autre et souvent, pour chaque auteur, dans le même travail.

B. Voie d'injection :

a) Sous-cutanée : 3-5-10-11-12-14-15-17-22-27-28-30-31-34-35-38-40-41-43-44-45

b) Intra-dermique : 23-46-47

c) Intra-musculaire : 9-13-25-34

d) Intraéritonéale : 34

C. Nombre d'injections

a) Une : 2-3-5-6-9-10-11-12-13-14-15-16-22-23-27-28-30-31-32-33-34-38-40-41-43-44-45.

b) Deux : 22-25-33-34-35-43-45

D. Temps écoulé entre la vaccination et l'épreuve

a) Minimum : 4 jours : 23

b) Moyen : 3-4 semaines : 2-3-4-5-6-9-10-11-12-13-14-15-17-22-23-25-27-28-30-32-33-34-35-38-40-41-43-44-45

c) Maximum : 4 mois : 32-35

L'épreuve virulente

A. Virus d'épreuve (souvent non précisé)

a) Virus bovin : 5-9-12-17-23-34

b) Virus porcin : 13-14-34

c) Virus de culture cellulaire : 11

B. Modalités d'infection

a) Contact : 5-10-12-13-30-31-32-33-35-40-41-43-44-45

b) "Torchon" : 12-22-33

c) Inoculation

1. intraveineuse : 28
2. intra-dermo-linguale : 3
3. groin : 11-12
4. sillon coronaire : 6-17-23-34
5. coussinet plantaire : 9-13-14

C. Calcul des résultats

a) Résultats exprimés en : protégés et non protégés : 2-3-5-6-9-10-11-12-13-14-15-17-22-25-27-28-30-31-32-33-35-38-40-41-43-44-45

b) Résultats exprimés en dose protectrice 50 p. 100 (DP_{50}) : 23-34.

Cette masse de travaux est déjà suffisamment importante pour que les résultats qui s'en dégagent aient une valeur indiscutable.

Or ces résultats, pris dans leur ensemble, peuvent être résumés de la manière suivante :

Si, dans les cas les plus favorables, on arrive à protéger les porcs dans la proportion des deux tiers environ (5-6-10-11-14-15-22-25-32-35-38-43-44-45), dans beaucoup d'autres cas on n'en protège guère que la moitié (2-3-5-10-12-22-23-27-31-33-34-41) ou même beaucoup moins encore (2-3-5-9-10-11-12-17-22-27-30-31-40-41) et cela malgré l'utilisation de doses vaccinales souvent très supérieures à celles que l'on emploie, avec succès, chez le boeuf.

Que doit-on conclure, sinon que jusqu'à présent, et quoi que l'on ait fait, la vaccination du porc n'a jamais donné, au laboratoire, que des résultats médiocres, voire à peu près nuls. Il n'y a donc aucune raison pour que, dans la pratique, les résultats soient meilleurs.

Or la dernière catégorie de travaux se rapporte précisément à des observations faites dans la pratique, qui semblaient infirmer cette manière de voir. On peut les diviser en deux groupes.

En premier lieu celles qui ont été faites en milieu infecté, donc dans les foyers même de fièvre aphteuse, avec l'intention d'en freiner ou même d'en arrêter l'extension (4-7-15-21-26-29-35-46-47).

En second lieu, celles qui ont été faites en milieu sain, mais considéré comme menacé, parce que se trouvant dans le voisinage plus ou moins éloigné de foyers connus de la maladie (7-15-19-35-43-44-45).

On pourrait noter que les observations du premier groupe n'ont plus qu'un intérêt rétrospectif, puisqu'aujourd'hui tous les porcs malades ou contaminés sont abattus immédiatement et qu'en conséquence leur vaccination ne peut être envisagée. Néanmoins elles méritent d'être rapprochées de celles du second groupe.

Dans les deux groupes, en effet, les auteurs sont en général d'accord pour reconnaître à la vaccination du porc une certaine efficacité. Quelques-uns l'expriment sans toutefois la préciser par des chiffres.

D'autres, par contre, avancent des résultats chiffrés qui sont des taux de protection. Or, et c'est là un fait assez curieux, ces taux de protection vont de 65% à 95% lorsque la vaccination est faite en milieu infecté (4-15-21) et de 75% à 100% lorsqu'elle est faite en milieu sain (7-13-15-43). Les deux séries de pourcentages ont entre elles une différence si faible qu'on peut les considérer comme sensiblement identiques.

Si donc nous retenons ces faits comme valables, nous sommes obligés d'admettre que la vaccination du porc aboutit aux mêmes résultats, qu'elle soit faite en milieu sain ou en milieu contaminé, ce qui signifierait que la vaccination arrête l'infection lorsqu'elle est déclenchée mais ne l'empêche pas d'apparaître.

Un tel paradoxe ne peut s'expliquer que parce que les observations n'ont probablement pas pu tenir compte d'éléments incontrôlables, totalement étrangers à la vaccination elle-même. C'est pourquoi cette dernière catégorie de travaux nous paraît d'une valeur bien insuffisante pour pouvoir modifier en quoi que ce soit la conclusion tirée des recherches de laboratoire.

Cependant, une alerte récente, due à une petite épizootie de fièvre aphteuse porcine, survenue en Corrèze, à la suite de l'introduction de porcs hollandais, vient de donner un regain d'actualité à cette question. Pour y répondre, l'expérience suivante est réalisée.

BUT DE L'EXPERIENCE

Si la prophylaxie de la fièvre aphteuse chez le boeuf donne, depuis quelques années, les magnifiques résultats que l'on sait, c'est parce qu'elle repose sur deux éléments fondamentaux, absolument complémentaires, à savoir : la destruction de tout foyer, dès son apparition, par abattage de tous les animaux des espèces sensibles au virus; la qualité des vacoins produits industriellement, lesquels sont capables, dans leur utilisation courante, de conférer au boeuf, au moins pendant un certain temps, et contre l'infection naturelle, une immunité excellente qui se traduit par un taux de protection voisin de 100%.

Si l'on considère maintenant la prophylaxie chez le porc, nous disposons du premier élément. Mais disposons-nous du second? En d'autres termes, les vacoins de production industrielle sont-ils capables de conférer au porc, contre l'infection naturelle, une immunité voisine de 100%. Dans la négative en sont-ils loin ou près?

Des réponses à ces deux questions, dépendra la solution du problème d'ordre plus général posé comme titre à ce travail.

METHODE

Nous utilisons la méthode indirecte qui consiste à calculer la DP_{50}, c'est-à-dire la dose de vaccin qui protège 50% des porcs contre l'apparition des lésions secondaires podales, consécutives à une inoculation virulente d'épreuve.

Cette DP_{50} sera établie à la suite d'une vaccination unique d'une part, à la suite d'une vaccination de rappel d'autre part. A partir des DP_{50} trouvées, nous tenterons de nous faire une idée de la quantité de vaccin nécessaire pour obtenir un taux de protection de 100% contre l'infection naturelle.

MATERIEL

Les porcs :

sont des Large White, agés de 12 semaines environ et pesant 40 à 45 kgs.

Le vaccin :

Aujourd'hui encore, les seuls vaccins dont on peut disposer en pratique pour la vaccination du porc sont des vaccins destinés au boeuf, et comme tels, préparés avec des souches de virus bovin, leur activité étant contrôlée pour le boeuf.

Cette activité étant variable d'un vaccin à l'autre, nous choisissons, pour obtenir les meilleurs résultats possibles chez le porc, un vaccin qui, tout en étant de préparation industrielle courante, assure au boeuf un taux de protection particulièrement élevé.

Le vaccin choisi est, en conséquence, un monovalent, préparé avec la souche de virus C Loupoigne 1953, et qui, à la dose de 1,66 ml chez le boeuf, révèle un log. d'indice K de 3,9 correspondant à un taux de protection très voisin de 100%.

Le virus d'épreuve :

Il semble qu'il soit nécessaire d'utiliser un virus adapté au porc, enfin d'obtenir au cours des épreuves des résultats interprétables (23-34).

Il arrive en effet qu'avec un virus bovin un nombre non négligeable de porcs témoins restent indemnes et que, parmi les porcs vaccinés, la proportion de ceux qui sont atteints soit sans rapport avec la dose vaccinale utilisée. Dans de telles condiditons, la détermination de la DP_{50} devient difficile, sinon même impossible.

Il importe en outre de s'assurer que le virus d'épreuve est antigéniquement identique à celui qui entre dans la composition du vaccin.

Or, comme il fallait s'y attendre, le virus C, isolé à partir des porcs, au cours de l'épizootie de la Corrèze, s'est montré sérologiquement le même que le virus C qui sévissait à la même époque en Hollande (37). Par ailleurs, une épreuve d'activité sur le boeuf, du vaccin préparé avec D Loupoigne, lequel, nous venons de le voir, donne, contre ce virus, un log K = 3,9 a donné également un log K de 3,9 contre C Hollande. Ces deux virus sont donc bien identiques.

Le virus C Hollande est alors choisi comme virus d'épreuve. A cet effet, il est d'abord passé sur le porc. Il est ensuite titré sur le porc, par détermination de la dose infectieuse à 50% (DI_{50}) et de la dose généralisante à 50% (DG_{50}), l'inoculation des dilutions virulentes étant faites, dans l'un et l'autre cas, au sillon coronaire. Les titres obtenus à la 40ème heure ont été supérieurs à 10^8 pour la DI_{50} et voisins de 10^7 pour la DG_{50}.

L'inoculation de 10^5 DI_{50} de ce virus à des porcs témoins, provoque, dans tous les cas, la lésion primaire au point d'inoculation et des lésions de généralisation aux 4 pattes. En conséquence, cette dose de virus est retenue pour les épreuves afin de donner à celles-ci toute la sévérité désirable.

APPLICATION DE LA METHODE

Vaccination :

Pour déterminer la DP_{50} après vaccination unique, 4 groupes de 8 porcs chacun reçoivent respectivement, par voie sous-cutanée, 1, 4, 16, 64 ml de vaccin. L'épreuve virulente a lieu 3 semaines plus tard.

Pour déterminer la DP_{50} après vaccination de rappel, 4 groupes de 8 porcs sont vaccinés dans les mêmes conditions. Deux semaines plus tard, ils sont revaccinés avec les mêmes doses de vaccin. L'épreuve virulente a lieu 3 semaines plus tard, soit donc 5 semaines après la première vaccination.

Epreuve :

Tous les animaux vaccinés reçoivent, par inoculation au sillon coronaire gauche du membre antérieur gauche, 1 ml d'une dilution du virus à 10^{-2}, contenant, par conséquent, environ 10^5 DI_{50}. Une seule lésion secondaire, apparaissant à l'un quelconque des autres sillons coronaires, suffit pour considérer que le porc n'est pas protégé. Le calcul de la DP_{50} est fait en fonction du nombre des porcs protégés et non protégés, selon la méthode classique des totaux cumulatifs.

En même temps, 8 porcs témoins reçoivent, de la même manière, la même quantité de virus.

Moment de lecture :

Le choix du moment de lecture a une importance considérable. Dans un travail antérieur (23), en effet, nous avions émis l'hypothèse que la méthode de la DP_{50} serait toujours affectée d'une erreur, parce que le porc pouvait, au cours de l'expérience, subir des surinfections à partir du sol ou des litières, se manifestant par des lésions podales, impossibles à distinguer des véritables lésions de généralisation. La DP_{50} pouvait donc varier en fonction au moment de la lecture des résultats.

Pour vérifier cette hypothèse, le pourcentage de porcs non protégés dans chaque groupe est établi chaque jour, pendant 4 jours, dans le présent travail.

Le résultat de cette observation est illustré par les courbes des figures I et II.

Figure I

Vaccination unique

Evolution dans le temps, en fonction des doses de vaccin, du pourcentage des porcs atteints de généralisation podales.

La figure I, qui se rapporte aux groupes de porcs qui n'ont été vaccinés qu'une fois, montre qu'à la 72ème heure aucun de ces porcs n'est protégé, sauf ceux du groupe qui a reçu 64 ml de vaccin. Mais il montre qu'à la 96ème heure, la moitié des porcs de ce dernier groupe ne le sont plus à leur tour et rien ne prouve que dans les jours suivants leur nombre n'aurait pas augmenté.

Deux hypothèses peuvent alors être formulées. Ou bien des lésions de surinfection se sont produites, à la suite d'accidentelles inoculations virulentes aux pattes, en imposant pour des lésions de généralisation, ou bien beaucoup plus simplement, les porcs présentent une immunité insuffisante au regard de l'infection d'épreuve.

Or, la figure II va nous permettre de choisir entre ces deux hypothèses.

Figure II

Vaccination de rappel

Evolution dans le temps, en fonction des doses de vaccin, du pourcentage des porcs atteints de généralisations podales.

La figure II, qui se rapporte aux groupes de porcs ayant été l'objet d'une vaccination de rappel, montre que, de jour en jour, le pourcentage de porcs non protégés varie régulièrement, en raison inverse de la dose vaccinale; il montre surtout, qu'entre la 72ème et la 96ème heure s'il atteint sa valeur maximale pour la dose la plus faible (1 ml), il reste constant ou presque pour les doses plus fortes.

Cela montre bien qu'à partir du moment où une immunité certaine est établie, les manifestations secondaires podales qui doivent apparaître à la suite de l'inoculation d'épreuve, apparaissent toutes, entre la 72ème et la 96ème heure; qu'au-delà de ce temps, s'il n'est pas exclu que d'autres lésions podales, mais de surinfection cette fois, apparaissent à leur tour, leur nombre doit être suffisamment faible pour ne pas modifier sensiblement les résultats de l'épreuve.

Une observation plus prolongée, d'ailleurs, introduisait une autre cause d'erreur beaucoup plus importante, due à la mortalité parmi les porcs d'expérience, qui est loin d'être négligeable.

Par conséquent, en retenant comme moment de lecture la 96ème heure qui suit l'inoculation virulente, nous nous plaçons dans les conditions les plus favorables pour que les résultats de l'épreuve soient interprétables.

RESULTATS

Valeur des DP_{50}

Elles sont fournies à partir du tableau I, qui rassemble les résultats des lectures faites à la 96ème heure qui suit l'injection virulente.

Tableau I

Vaccination		Vaccination unique			Vaccination de rappel			Témoins	
Doses en ml	Log. Dose	Nbre de porcs	non protégés	protégés	Nbre de porcs	non protégés	protégés	Nbre de porcs	Généralisation aux 4 pattes
1	0,00	7	7	0	7	7	0	8	8
4	0,60	8	8	0	8	4	4		
16	1,20	6	5	1	7	2	5		
64	1,80	6	3	3	5	1	4		
		Log.DP_{50} = 1,71 ± 0,37 DP_{50} = 51 ml (pour P = 0,95, limites de confiance: 22ml à 100ml)			Log.DP_{50} = 0,82 ± 0,41 DP_{50} = 6,6 ml (pour P = 0,95, limites de confiance: 2,5ml à 17ml)				

Le tableau I montre que pour obtenir, à la suite de l'inoculation d'épreuve, un taux de protection de 50% contre les généralisations podales, il faut utiliser :

soit une dose unique de vaccin de 51 ml, représentant 30 fois la dose bovine, qui dans les conditions normales d'emploi donne près de 100% de protection chez le boeuf;

soit deux doses de 6,6 ml de vaccin, administrées à 3 semaines d'intervalle, représentant chacune 4 fois la même dose bovine.

Interprétation des résultats

Une première constatation s'impose : on obtient le même résultat, à savoir un taux de protection de 50%, avec une quantité beaucoup moindre de vaccin, si au lieu de vacciner en une fois, on le fait en 2 fois à 3 semaines d'intervalle.

Mais quelle quantité de vaccin faut-il utiliser pour obtenir, au regard de l'infection naturelle, un taux de protection voisin de 100% ?

En ce qui concerne la vaccination du boeuf, cette donnée a pu être établie à un moment où nous avions, en France, des milliers de foyers de fièvre aphteuse et où la permanence de l'infection naturelle était solidement assurée par le maintien en vie des animaux malades. Il a donc été possible, par l'observation de plus de deux millions d'animaux vaccinés, de faire une comparaison entre les résultats des épreuves de laboratoire et ceux des campagnes de vaccination. Et c'est ainsi que nous avons été amenés à considérer qu'à un taux de protection de 70 à 75%, obtenu en laboratoire, et traduit par $0,6 < \log. K < 1,2$, correspondait un taux de protection voisin de 100% dans la pratique.(24)

En est-il de même pour le porc? Il est impossible de le savoir puisqu'aucune des conditions qui ont rendu possible la solution du problème pour le boeuf, et qui seraient nécessairement les mêmes pour le résoudre pour le porc, n'existent aujourd'hui.

Nous en sommes alors réduits à faire des hypothèses. Admettons donc qu'il soit nécessaire d'avoir, au laboratoire, comme pour le boeuf, un taux de protection de 70 à 75% et admettons encore que, comme pour le boeuf également, il faille 3 fois la DP_{50} pour obtenir ce taux de protection de 70 à 75% (18).

Il en résulterait que pour obtenir chez le porc, contre l'infection naturelle, un taux de protection voisin de 100%, il faudrait :

ou bien vacciner en une fois avec 150 ml de vaccin, soit 90 doses bovines;
ou bien vacciner en deux fois, à 3 semaines d'intervalle avec 20 ml de vaccin, soit, chaque fois, 12 doses bovines.

Sans attacher à ces chiffres un caractère définitif, puisqu'aussi bien nous n'avons pas les moyens de les vérifier, il n'en reste pas moins que pour atteindre notre objectif, il faut sans aucun doute utiliser des doses de vaccin supérieures à celles qui fournissent le taux de protection de 50%. Ce qui, de toute manière, nous conduit à des doses tellement grandes qu'il ne semble pas qu'elles aient été jamais utilisées, même expérimentalement. Et c'est bien ce qui explique les résultats médiocres ou nuls observés dans tous les laboratoires.

A plus forte raison n'ont-elles jamais été utilisées en pratique, et ne le seront-elles sans doute jamais.

CONCLUSION

Avec les meilleurs vaccins antiaphteux dont nous disposons actuellement, et dans la limite des conditions pratiques de leur emploi, il semble bien illusoire d'espérer obtenir une immunisation correcte du porc.

Certes, dans ces toutes dernières années, des résultats spectaculaires d'arrêt immédiat de petites épizooties porcines ont été obtenus par la mise en oeuvre simultanée des mesures de police sanitaire et de la vaccination. Mais dans ces cas, la part de succès qui revient à cette dernière doit être bien mince, si toutefois même elle existe.

Aussi de telles constatations nous paraissent tout à fait insuffisantes pour attribuer à la vaccination une efficacité que le laboratoire ne parvient pas à révéler.

BIBLIOGRAPHIE

ALTERAUGE, W., Über das Problem der Immunisierung des Schweines gegen Maul-und-Klauenseuche. Monatsh. Tierhlk., 1962, 14, 142, 148.

ANDREEV, E.V., KONOZENKO, P.A., En russe (Sur l'immunisation active des porcs contre la fièvre aphteuse). Veterinarija, U.S.S.R., 1964, 41, no. 8, 37-38.

ARMBRUSTER, O., GARRE, H., PILZ, W., SCHWECKENDIEK, O.E., Zum Problem der aktiven Immunisierung des Schweines gegen MKS mit verschiedenartigen Vakzinen. Vet. Med. Nach., 1960, 75-80.

BELIN, M., De la vaccination du porc contre la fièvre aphteuse. Bull. Acad. Vet. Fr., 1948, 21, 279-280.

BENGELSDORFF, H.J., SCHNEIDER, B., Immunisierungsergebnisse mit saponinhaltigem Maul-und-Klauenseuche-Gewebekulturvirus - Adsorbatvakzinen beim Schwein, Bull. Off. Int. Epizoot., 1964, 61, 1185-1195.
Résultats de l'immunisation du porc par des vaccins antiaphteux adsorbés et saponinés préparés avec du virus obtenu en culture tissulaire. Bull. Off. Int. Epizoot., 1966, 61, 1197-120.

BENNDORF, E., Versuche zur Vakzinierung von Schweinen gegen Maul-und-Klauenseuche-Virus Typ O mit einer über das Mausgehirn gewonnenen Lebendvirusvakzine. (Kurzmitteilung) Arch. Exp. Vet. Med., 1966, 20, 151-156.

BÖHNE, F., Die Schutzimpfung von Schweinen gegen die Maul- und-Klauenseuche im Rahmen der praktischen Seuchenbekämpfung, Monatsh. Tierhlk., 1961, 13, 299-312.

BRUMANN, W., Über Massnahmen zur Bekämpfung der Maul- und-Klauenseuche der Schweine. Dtsch. Tierärztl. Wchschr. 1963, 70, 229-235.

BURROWS, R., The Behaviour of some Modified Strains of Food-and-Mouth Disease Virus in the Pig. II Immunogenicity, Bull. Off. int. Epizoot., 1964, 61, 1277-1293.

CAPORALE, G., GALASSI, D., GRAMANZI, F., ROSSI, G.P., Sulla possibilità di vaccinare i suini contre l'afta epizootica. Att. Sec. Ital. Sci. Vet. Sorrento, 1962, 16, 467-475.

GALASSI, D., Tentativi di vaccinazione dei suini a mezzo di vaccini allestiti con virus aftoso coltivato su cellule renali di vitello. Vet. Ital., 1962, 13, 667-686.

GEIGER, W., OTTE, B., Di Vakzination des Schweines gegen Maul- und-Klauenseuche, Monatsh. Tierhlk., 1958, 10, 35-49.

GIRARD, H.C., CHARUTAMRA, U., SUPAVILAI, P., SMITINONDANA, P., PUNYA-UPAPHAT, S., CHANDRAKEO, T., Vaccination antiaphteuse du porc à l'aide d'un virus-vaccin de type Asia 1. Bull. Off. Int. Epizoot. 1963, 59, 1081-1092.

GIRARD, H.C., CHARUTAMRA, U., SMITINONDANA, P., Vaccination antiaphteuse du porc contre le virus Asia 1 à l'aide du vaccin formolé saponiné - Bull. Off. Epiz. 1964, 61, 1295-1300.

GRIBANOV, V., Résultats de l'épreuve du vaccin antiaphteux VIEV préparé avec un virus adapté au lapin. Bull. Off. Int. Epiz. 1955, 43, 632-635.

HEINIG, A., Tod-und-Lebensvirusimpfstoffe zur Bekämpfung der Maul-und-Klauenseuche (MKS) - Dtsche. Akad. Landwirtsch. - Wissensch. Berl. Sitz. Berl. 1964, 13, 18P.

HEINIG, A., OLECHNOWITZ, AF., BENDORF-WEYNE D., Zur aktiven Immunisierung der Schweine gegen Maul- und Klausenseuche mit Saponin Vakzine. Arch. Exp. Vet. Med. 1965, 19, 133-138.

HENDERSON, W.M., LUCAM F., GANIA PIRAZZI A., Le contrôle des vaccins antiaphteux à virus inactivé. Solution adoptée en Amérique du Sud. Symposium internat. Virologie animale. Off. Int. Epizoot. Rt Ass. Int. sec. microbiole Lyon, 1962, 24, 71-88.

JIVOIN P., Mijloc eficient pentru a combatere la febre aftosa. Rev. Inter. pentru Agricult. 1964, 1, 94-97

JOUBERT, L,, MACKOWIAK, C., FONTAINE, J., La fièvre aphteuse du Porc. Rev. Med. Vet., 1966, 177, 331-341.

KAMPHANS, S., SCHNEIDER, B., Praktische Erfahrungen bei der Immunisierung des Schweines gegen Maul-und-Klauenseuche. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 1963, I, 1-3.

KUBIN, Ein Beitrag zum Problem der Immunisierung von Schweinen gegen die Maul-und-Klauenseuche. Wien, Tierheilk. Monatsschr., 1962, 49, 427-435.

LUCAM, F., DHENNIN, L., FEDIDA, M., Essais de vaccination antiaphteuse intradermique chez le porc. Résultats obtenus au laboratoire. Bull. Off. Inter. Epizoot., 1962, 57, 924-934.

LUCAM, F., FEDIDA, M., Standardisation de l'efficacité du vaccin antiaphteux. Bull. Acd. Vet. Fr., 1961, 34, 371-376.

LYSENKO, I.P., TSYMBAL, A.M., En russe. (Immunisation simultanée du porc contre la peste porcine, la fièvre aphteuse, la maladie d'Aujesky et le rouget). Veterinarija, S.S.S.R., 1961, 38, no. 1, 30-33.

MARGERIN DU METZ, J., BONNAUD, P., La vaccination contre la fièvre aphteuse chez le porc par la méthode intradermique. Res. Med. Vet. Alfort, 1957, 133, 579-583.

MICHELSEN, E., Experiences on vaccination of pigs. Arch. Exp. Vet. Med., 1961, 15, 317-322.

MOHLMANN, H., Die aktive Immunisierung des Schweines gegen Maul-und-Klauenseuche Arch. Exp. Vet. Med., 1950, 2, 79-85.

MORANDI, A., L'afta epizootica nei suini della bassa Lodigiana. Risultati ottenuti con le siero-profilassi, la vaccinazione, la sierovaccinazione simultanea. Veterinaria Milano, 1962, 11, 49-54.

MOROZZI, A., Tentativi di vaccinazione dei suini contro l'afta epizootica. Art. Sec. Ital. Sci., Vet. 1960, 14, 694-696.

MUNTIU N., DOHOTARU, V., POPA, M., BERGAN, A., MARINESCU, I., TOMESCU, A., Essais effectués en vue de l'obtention d'un vaccin antiaphteux destiné à la vaccination du porc. Bull. Off. Int. Epizoot. 1964, 61, 1303-1310.

NATHANS, I., Vaccinatio van Varkens gegen Mond-og Klauwzeer met geinactiveerd virus bevattende entstoffen. These Doct. Vet. Utrecht., 1965.

PETRENKO, B.G., ANDREEV, E., ROTOV, V.J., KONOZENKO, P.A., OMELAENKO, A.A., CHECHETNITKA, I.P., En russe (Vaccin antiaphteux au cristal violet). Nanch. Trud. Ukrain Inst. eksp. Vet., 1962., 28, 5-26.

POUL, J., PRUNET, P., CAUCHY, L., DURAND, M., Recherches sur la vaccination antiaphteuse du porc. Bull. Off. Int. Epizoot. 1964, 61, 1233-1249.

RÖHRER, H., Zum Maul-und-Klauenseuche Geschehen in der Deutschen Demokratischen Republik im Jahre 1962/63. Monatsh. Vet. Med., 1964, 19, 201-208.

RATNER, I., SKORIN, I.E., AVILOFF, V., Cultivation of the FMD virus in surviving Epithelial Tissue of pigs. 17ème congrès. Mond. Vet. Hanover. 1963, 5, 589-592.

ROUMIANTZEFF, M., DUBOUCLARD, C., FONTAINE, J., GILBERT, H., Méthodes sérologiques utilisées pour l'étude des variantes du virus aphteux. Bull. Soc. Sci. Vet. Lyon, 1966, 68, 41-54.

SCHNEIDER, B., BENGELSDORFF, H.J., Immunisierung des Schweines gegen Maul-und Klauenseuche mit Gewebskulturvirus-Saponinvakzine. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 1963, 70, 482-485.

SCHNEIDER, J., Über die Möglichkeiten einer umfassenden Bekämpfung der Maul-und Klauenseuche. Wissensch. Z. Karl. Marx Universität Leipzig., 1963, 12, 751-769.

TOUSSIENG, E., FOGEDBY, E.F., FRENKEL, H.S., Van WAVEREN, G., Aktiv Immunisering af Svin og Kvaeg mod Mund-og Kovesyge udfört med Kulturvirus dels adsoberet dels frit. Maaneds Durl., 1938, 50, 353-365.

TRAUB, E., SCHWOBEL, W., Versuche zur Ergründung des mangelhaften Immunisierungsvermögens von Maul-und-Klauenseuche-Vakzinen bei Schweinen. Monatssch. Tierhlk. 1959, 11, 1-13.

TRIVISIANI, J.G., La fièvre aphteuse de porc. These Doct. Vet. Lyon 19-64. Impr. Bosc. Lyon Edit.

UBERTINE, B., NARDELLI, L., BAREI, S., GUALANDI, G.L., PANINA, G.F. BABINI, C., Vaccination anti-aphteuse par un vaccin inactivé des porcs d'élevages industriels de la plaine du PO. Bull. Off. Int. Epizoot. 1964, 61, 1311-1349.
La vaccinazione antiaftosa dei suini con vaccini inattivato negli allevamenti industriali. Vet. Ital., 1964, 15, 789-823.

Van BEKKUM, J., Eervaringen met de enting van varkens tegen mond-og klauwzeer, Tijdschr. Diergeneeesk. 1962, 87, 1680-1686.

Van BEKKUM, J.G., FRENKEL, S., NATHANS, I., De enting van varkens tegen mond-og klauwzeer, Tijdschr. Diergeneesk., 1963, 88, 1936-1944.

VARENNE, H., DECHAMBRE, L., Le problème de la vaccination antiaphteuse du porc. Essais et résultats de la méthode intradermique. Rec. Med. Vet. 1957, 133, 309-318.

VARENNE, H., Le problème de la vaccination antiaphteuse chez le porc. Essais et résultats de la méthode intradermique. Bull. Off. Int. Epizoot. 1960, 53, 793-808.

FIGURE 1

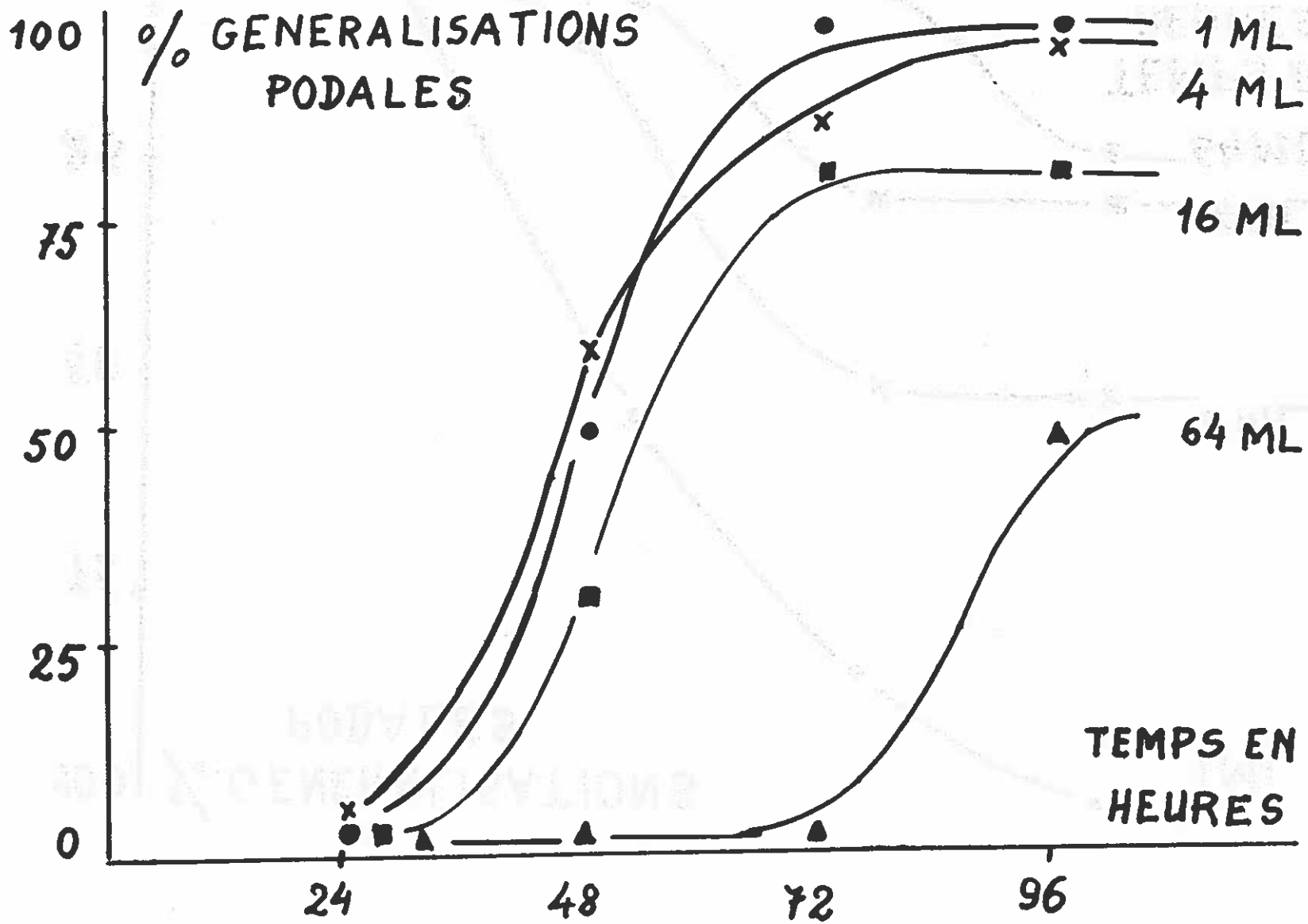
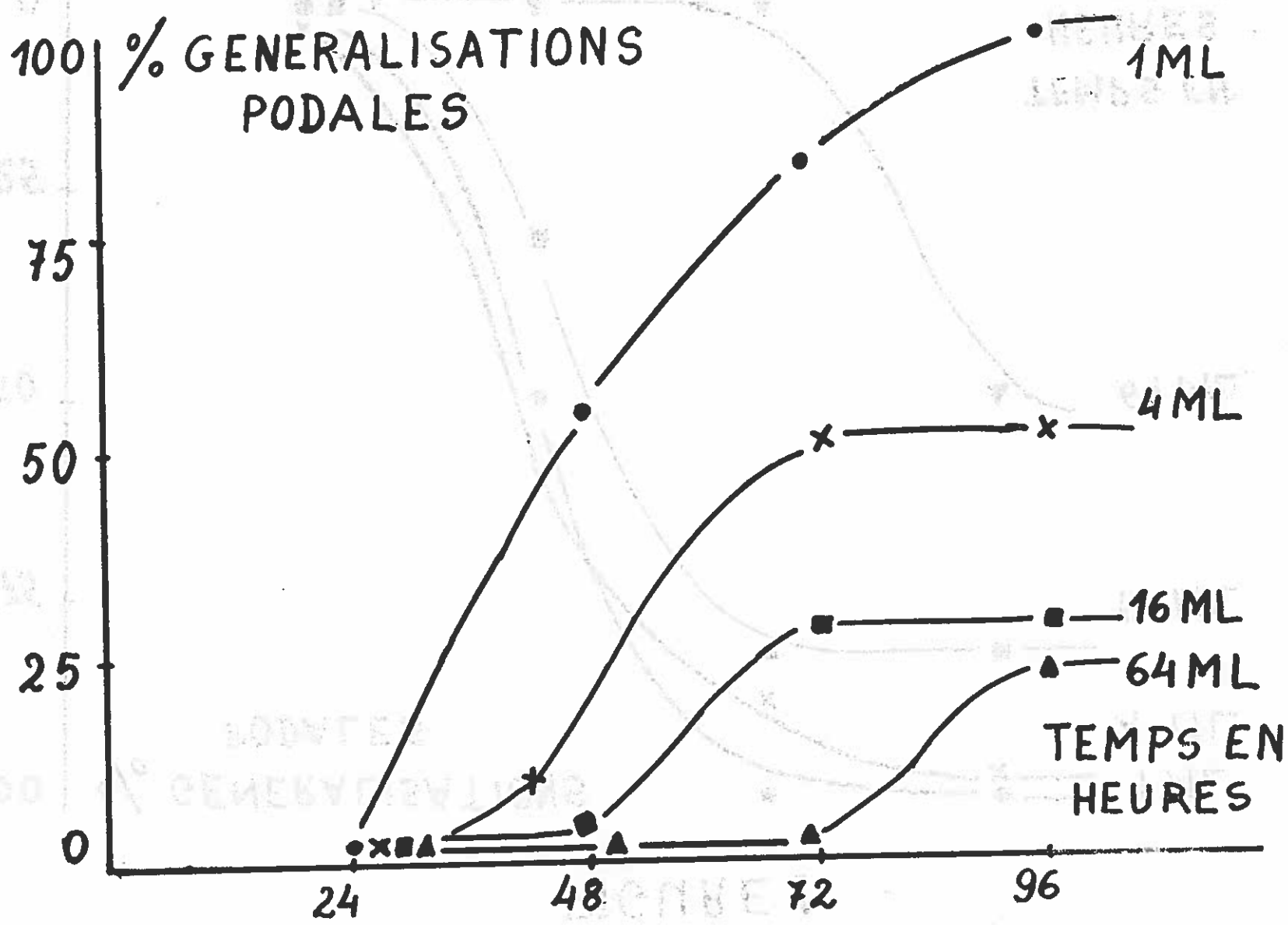

100
75
50
25
0
% GENERALISATIONS PODALES
1 ML
4 ML
16 ML
64 ML
TEMPS EN HEURES
24
48
72
96

FIGURE II


% GENERALISATIONS PODALES
100
75
50
25
0
24
48
72
96
1ML
4ML
16ML
64ML
TEMPS EN HEURES

ANNEXE 18

NOTES SUR LES RESULTATS D'EXPERIMENTATIONS UTILISANT DES VACCINS A BASE DE VIRUS APHTEUX INACTIVE, CHEZ LES PORCS

par

R. Burrows **

Les observations expérimentales et sur le terrain portant sur de nombreuses années ont maintes fois mis en évidence les difficultés d'immunisation des porcs avec des vaccins antiaphteux inactivés. Beaucoup d'hypothèses ont été avancées pour expliquer le faible pouvoir immunisant chez les porcs de vaccins qui ont donné de bons résultats chez les bovins. Les raisons invoquées pour expliquer le succès ou l'échec d'un vaccin particulier, ont habituellement mis l'accent sur l'importance d'une ou de plusieurs variables. Ces variables comprennent celles ayant trait à l'origine du virus, à sa concentration, ainsi qu'au procédé d'inactivation, aux adjuvants, au volume de la dose, à la voie d'administration, à l'âge et à la constitution génétique du porc.

A Pirbright, nous ne pouvons pas encore produire uniformément un vaccin protégeant la majorité des porcs à l'égard d'une infection expérimentale à laquelle ils sont soumis trois semaines après la vaccination. Au cours des dernières années, nous avons effectué un certain nombre d'expérimentations et nous commençons à accumuler une masse d'éléments qui, nous l'espérons, aboutira à une meilleure compréhension des problèmes en cause.

La majorité des vaccins utilisés dans la présente expérience ont été produits par mes collègues Capstick, Telling et Brown et un grand nombre de ces vaccins ont été éprouvés sur bovins et cobayes. Tous étaient inactivés par traitement avec de l'acétyléthylèneimine (AEI) et, s'il n'est pas autrement indiqué, contenaient 50 pour cent de gel d'hydroxyde d'aluminium. Dans le cadre de ce rapport, je propose de traiter seulement des observations que nous avons faites sur les porcs. Celles-ci sont présentées dans une suite de tableaux, chacun d'eux comportant une brève introduction et des commentaires sur les conclusions.

La réponse immunitaire des porcs aux vaccins préparés sur différents tissus hôtes

Une souche murinisée de virus C997 qui était capable de provoquer des lésions étendues sur les muscles et le myocarde des porcs a été utilisée. Les vaccins ont été préparés à partir de coeur de porc infecté, de carcasses de souris et de cultures BHK.

Taux d'anticorps moyen du groupe

(Moyenne géométrique - inverse du Log. de la dilution de sérum)

Vaccin C 997 murinisé	Nombre de porcs	Dose	Jours après vaccination 0	7	14	21
A. Coeur de porc	5	8,0*	≤ 0,5	1,48	1,20	0,82
	5	7,0	≤ 0,5	1,12	0,76	0,62
	5	6,0	≤ 0,5	0,72	0,70	0,52
B. Carcasse de souris	5	7,2	≤ 0,5	1,16	0,78	0,48
C. BHK/1	5	8,7	≤ 0,5	1,94	1,46	0,80

* Pouvoir infectant (log. 10 ID_{50} souris) avant inactivation, d'une dose de 10 ml injectée par voie sous-cutanée.

** Animal Virus Research Institute, Pirbright, Surrey, Angleterre.

Commentaires

En général, les types de réponse immunitaire (formation d'anticorps), ont été semblables et en relation avec l'infectiosité d'origine de la dose de vaccin et indépendants du tissu hôte à partir duquel le vaccin était préparé.

La réponse immunitaire a présenté cette même caractéristique chez la majorité des porcs ayant reçu des vaccins inactivés. Les taux maximums d'anticorps ont été enregistrés 4 à 7 jours après la vaccination. Ce maximum a été suivi d'une chute rapide, les taux d'anticorps étant négligeables après 21 jours.

Pouvoir immunigène de vaccins similaires préparés à partir de différentes souches de virus

Bien que la majorité de nos vaccins inactivés ait conféré une faible protection à l'égard d'une infection d'épreuve, des études ont montré que les vaccins préparés à partir de certaines souches de virus diffèrent dans leur aptitude à provoquer la formation d'anticorps. Les mesures in vitro du contenu antigénique d'une préparation de virus comportent l'évaluation du pouvoir infectant et du pouvoir de fixation du complément. Les résultats d'un certain nombre de contrôles de vaccins contenant des quantités comparables d'antigènes, sont présentés ci-dessous.

I. Virus produit en cultures de couches monocellulaires BHK et concentré par absorption sur hydroxyde d'aluminium (F. Brown)

Virus	Dose*	Unités CF (FB)	Nombre de porcs	Jours après vaccination 0	4	7	10	14	21	Nombre d'animaux protégés
SAT 1 SA.13/61	9,6	40	8	≤ 0,8	1,73	1,75	1,75	1,67	1,62	4
A-Irak 24/64	9,4	72	8	≤ 0,8	≤0,94	≤0,9	≤0,9	≤0,9	≤0,9	1
O-Israël 1/63	9,0	76	8	≤ 0,8	1,26	1,50	1,40	1,30	1,01	0

II. Virus produit sur cultures en suspension BHK (P.B. Capstick)

Virus	Dose*	Unités CF (PBC)	Nombre de porcs	Jours après vaccination 0	4	7	10	14	21	Nombre d'animaux protégés
A 119	7,1	432	8	≤ 0,3	1,22	1,26	—	1,0	≤0,86	1
A Irak	7,5	475	8	≤ 0,8	≤0,9	≤0,8	≤0,85	≤0,9	≤0,9	1
O Israël	7,3	447	4	≤ 0,8	1,08	1,2	1,08	≤0,95	≤0,85	0

* Dose de 5 ml.

Commentaires

Dans les deux séries d'essais, les vaccins A/Irak contenaient apparemment une quantité égale ou supérieure d'antigènes. La réponse immunitaire à l'injection des vaccins a été cependant inférieure à celle provoquée par les autres préparations.

Variation du lieu d'injection sous-cutanée des vaccins

Le point choisi habituellement pour l'inoculation sous-cutanée chez le porc est la base de l'oreille. Des expériences effectuées avec des produits colorés ont montré que l'inoculum est fréquemment déposé dans la graisse sous-cutanée de la région. L'influence possible de ce facteur sur l'efficacité du vaccin a été recherchée au cours de deux expériences en inoculant la moitié des animaux par voie sous-cutanée dans la région axillaire.

Expérience	Virus	Nombre* de porcs	Lieu	Jours après vaccination 0	7	14	21	27	Nombre d'animaux protégés
1	A 119	12	Oreille	⩽ 0,5	1,46	1,17	1,26	1,11	5
		12	Aisselle	⩽ 0,5	1,40	1,37	1,15	1,20	6
2	A Irak 24/64	16	Oreille	Saignée à 0, 4, 7, 10, 14 et 20 jours					1
		16	Aisselle	Taux moyen d'anticorps = 0,90					1

* Chaque groupe étant constitué à partir de diverses doses de vaccin.

Commentaires

Les résultats obtenus pour chaque lieu d'inoculation n'ont pas révélé de nette différence. Ubertini et al (1964) ont effectué des essais semblables et n'ont pas trouvé de différence dans l'efficacité des vaccins inoculés en différents endroits.

Variation du contenu d'hydroxyde d'aluminium d'un vacoin

La concentration de gel d'hydroxyde d'aluminium a varié de 40 à 70 pour cent du volume dans la plupart des vaccins expérimentaux et commerciaux utilisés chez les porcs. On a recherché l'effet de la réduction de la concentration à 30 pour cent.

Virus A 119 moC Couches monocellulaires BHK 2

Concentration d'hydroxyde d'aluminium	Nombre de porcs	Dose	Jours après vaccination 0	7	14	21
50 %	5	7,4	⩽ 0,5	1,65	1,1	0,8
30 %	5	7,4	⩽ 0,5	1,63	1,0	0,8
30 %	5	6,9	⩽ 0,5	1,45	0,75	0,7

Commentaires

Il n'a pas pu être décelé de différence dans la réponse immunitaire entre les vaccins ayant deux concentrations différentes d'hydroxyde d'aluminium.

Vaccins contenant de la saponine

Plusieurs chercheurs ont maintenant fait état de résultats favorables en utilisant chez des porcs, des vaccins saponisés. Les concentrations de saponine utilisées ont varié de 50 mg à 1 mg par dose et la plupart des vaccins contenant également de l'hydroxyde d'aluminium.

Nathans (1965) a effectué des expériences pour déterminer la concentration de saponine utilisable chez le porc, sans provoquer de réactions indésirables. Il a conclu que 5 mg par dose ou plus ont provoqué des réactions tissulaires et des troubles visibles sur quelques animaux.

On n'a pas pu trouver de corrélation entre la réaction locale et la réponse immunitaire. S'il n'est pas autrement indiqué, nos vaccins saponisés ne contenaient pas d'hydroxyde d'aluminium.

Réponses immunitaires en relation avec la concentration de saponine

Vaccin	Concentration de saponine	Nombre de porcs	Jours après vaccination 0	4	7	10	14	21	Nombre de protégés
A Irak	60	5	0,8	0,96	0,34	0,90	1,18	1,22	2
Dose 7,0	30	5	0,95	1,46	1,60	1,52	1,58	1,54	3
435UCF	10	20	0,92	1,13	1,59	1,44	1,24	1,21	5
O Israël	15	4	0,8	1,4	1,85	1,82	1,55	1,55	3
Dose 7,3	10	4	0,8	1,25	1,75	1,65	1,52	1,35	1
447UCF	5	4	0,8	1,4	1,87	1,67	1,45	1,20	1
	1	4	0,8	1,37	1,95	1,70	1,47	1,27	2

Commentaires

On n'a pas pu voir, dans les réponses immunitaires de groupe, de différences selon les concentrations de saponine comprises entre 15 et 1 mg par dose. Il est apparu que les doses de saponine plus importantes (60 mg) atténuaient la réponse immunitaire.

On a comparé entre eux des vaccins contenant de la saponine seulement, de la saponine et de l'hydroxyde d'aluminium et de l'hydroxyde d'aluminium seulement.

		Nombre de porcs	Jours après vaccination 0	4	7	10	14	21	Nombre de protégés
O Israël Dose 7,3 447UCF	5 mg saponine	4	≤ 0,8	1,4	1,87	1,67	1,45	1,2	1
	5 mg saponine + hydroxyde d'aluminium	4	≤ 0,8	1,42	1,90	1,65	1,52	1,27	0
	hydroxyde d'aluminium	4	≤ 0,8	1,08	1,20	1,08	≤0,95	≤0,85	0
O Israël Dose 8,3 237UCF	5 mg saponine + hydroxyde d'aluminium	4	≤ 0,8	1,22	1,62	1,37	1,2	1,05	1
	hydroxyde d'aluminium	4	≤ 0,8	1,17	1,22	1,20	≤0,87	≤0,82	0

Commentaires

Les deux essais effectués avec des antigènes O Israël ont montré que la saponine à elle seule, ou associée à l'hydroxyde d'aluminium était supérieure à la préparation d'hydroxyde d'aluminium. On n'a pas pu déceler de différence dans la réponse immunitaire des groupes recevant de la saponine seule ou de la saponine associée à de l'hydroxyde d'aluminium.

Epreuve par inoculation du coussinet plantaire

L'épreuve a été effectuée par inoculation du coussinet plantaire d'un pied, ainsi qu'il a été indiqué à la réunion de ce groupe tenue en 1963 (Burrows, 1963). Le virus d'épreuve était d'origine bovine et a été titré au moment de l'épreuve sur bovins, porcs et souris. Les deux tableaux ci-dessous indiquent les résultats des titrages comparatifs et le comportement de ces souches au titrage sur porcs.

Titrages comparatifs de souches bovines de virus

Virus	Souris par intrapéritonéale	Langue de bovins	Porc		
			Coussinet plantaire	Bourrelet coronaire	Langue
A 119	7,5*	6,1	4,6	2,4	2,4
A Kemron	6,5	5,8	5,2	1,3	-
O Israël 1/63	7,2	6,7	5,3	3,0	-
C 997	7,0	5,6	5,6	2,7	3,9
SAT 1 SA.13/61	7,9	7,2	5,6	-	-
SAT 1 Soudan 2/61	7,5	6,5	6,0	3,3	-
SAT 1 Turquie 323/62	7,8	6,6	5,1	2,6	4,1
SAT 3 SA. 57/59	7,9	6,4	4,9	4,0	4,0

* Log_{10} ID_{50} par ml de 1/25 EK de filtrat d'épithélum de langue bovine.
\- = non testé

Relations entre le temps nécessaire à la formation des vésicules et la concentration de virus inoculé dans le coussinet plantaire

Virus	Nombre d'ID_{50}* inoculées			Lésions secondaires
	≤ 4	5-40	≥ 40	
A 119	30 **	28	23	42
A Kemron	29	28	23	46
O Israël 1/63	30	26	OTR	41
C 997	26	26	24	42
SAT 1 Soudan 2/61	28	24	18	41
SAT 1 SA.13/61	26	26	24	47
SAT 3 SA.57/59	30	24	24	43

* Estimée d'après la dilution critique de groupe 30 heures après inoculation.

** Temps moyen en heures après inoculation.

OTR = Taux de titrage extérieur.

Corrélation entre titre d'anticorps (Colour Test) et immunité à la formation de lésions secondaires suivant l'épreuve d'inoculation du coussinet plantaire

Les taux d'immunité des porcs vaccinés avec des préparations inactivées, n'ont pas été suffisants pour empêcher l'apparition de lésions locales aux points d'inoculation (dose d'épreuve : 500 à 3 000 ID_{50} (coussinet plantaire de porc). Des lésions secondaires se sont développées sur la majorité des animaux aux second et troisième jours, suivant l'épreuve; celles qui sont apparues aux 4ème et 5ème jours ont été habituellement atténuées. Pour établir la corrélation les animaux ont été classés en protégés et non protégés contre la formation de lésions secondaires.

	Titres d'anticorps sériques			
	≤ 1,0	1,1 - 1,3	1,4 - 1,6	≥ 1,7
Nombre de porcs	142	25	21	14
Nombre de porcs protégés	2	7	10	14
Pourcentage de porcs protégés	1,4	28	48	100

Commentaires

Les résultats font apparaître une corrélation certaine entre le titre d'anticorps et la réaction consécutive à l'épreuve. Le taux d'immunité 50 pour cent est approximativement de 1,5, chiffre semblable à celui trouvé pour les bovins éprouvés par inoculation de la langue.

Nathans a évalué un taux d'immunité 50 pour cent beaucoup plus bas (0,9) chez des animaux exposés à une infection par contact. D'après ce chiffre, un grand nombre de vaccins utilisés dans nos expérimentations auraient conféré une certaine protection à l'égard d'une infection par contact.

REFERENCES

Burrows, R. (1963). Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Pirbright, June, 1963.

Nathans, I. (1965). Thesis, University of Utrecht.

Ubertini, B., Nardelli, L., Barei, S., Gualandi, G.L. Panina, G.F. and Bagini, C. (1964). Bull. Off. int. Epizoot., 61, 1311.

ANNEXE 19

VACCINATION ANTIAPHTEUSE DU MOUTON

par

J. Fontaine, P. Bornarel, C. Dubouclard, C. Stellmann, R. Lang *

La vaccination antiaphteuse du mouton est pratiquée depuis fort longtemps, en général avec succès. Cependant, son étude expérimentale rencontre un obstacle majeur : l'absence d'une technique précise de contrôle de l'immunité antiaphteuse chez cette espèce. En effet, les lésions aphteuses apparaissent irrégulièrement dans la maladie clinique (15) en général, et après infection expérimentale (1) en particulier. Les agneaux (7) peuvent être atteints de maladie septicémique parfois mortelle, sans lésions apparentes des onglons ou de la bouche.

Les études expérimentales (1, 12, 16) sur la vaccination du mouton ont été jusqu'ici limitées et c'est la raison pour laquelle, depuis quelques années, nous cherchons à mettre au point une méthode de contrôle de l'immunisation des animaux de l'espèce ovine. Ainsi que nous l'avons précédemment exposé (5), une méthode de contrôle de l'infection aphteuse, après inoculation de virus, par lecture des aphtes primaires et secondaires, s'est révélée décevante. En effet, comme dans la maladie clinique, les lésions macroscopiquement caractéristiques de la fièvre aphteuse apparaissent très irrégulièrement, même après une inoculation massive d'un virus aphteux préalablement adapté au mouton par passages successifs.

Au cours de l'expérimentation préliminaire, nous avons mis en évidence une virémie chez les animaux neufs inoculés, ce qui nous permet de vérifier la présence ou l'absence d'infection aphteuse. Nous avons alors mis au point une méthode de contrôle de la vaccination du mouton par recherche de la virémie après inoculation virulente (5).

L'emploi de doses fractionnées de vaccin antiaphteux, comme pour les cobayes (13) et les bovins (14), nous a permis d'appliquer une méthode quantitative de contrôle pour l'étude des vaccins, de la durée d'immunité ou d'immunisation (10), etc... Le titrage des anticorps avant et après vaccination confirme ces résultats.

I. MATERIEL ET METHODES

1. Moutons

Nous choisissons des moutons de plus de six mois, non vaccinés contre la fièvre aphteuse et achetés dans le commerce en lots aussi homogènes que possible.

2. Vaccins

Ce sont des vaccins saponinés, de production courante, inactivés par action ménagée de la chaleur et du formol et adsorbés sur hydroxyde d'alumine, préparés pour la vaccination des bovins. La dose monovalente bovine moyenne est de 1,6 ml et la dose trivalente de 5 ml.

Les vaccins monovalents et trivalents sont contrôlés préalablement ou simultanément sur cobayes et bovins, par établissement des doses vaccinantes 50 % (DVC_{50}, DVB_{50}).

---

* Institut français de la fièvre aphteuse, Lyon, France.

3. Virus

A. Adaptation au mouton

Pour obtenir une virémie chez tous les animaux inoculés, il est nécessaire d'adapter le virus à l'espèce ovine. Dans nos expériences, le virus de départ a toujours subi préalablement quelques passages sur animaux de l'espèce bovine et est constitué d'aphtes linguaux.

Ces aphtes sont broyés puis mis en suspension, dans un liquide tamponné à pH 7,5 additionnée d'antibiotiques, dans la proportion de 1 gramme d'aphtes pour 9 ml de tampon. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 6 000 tours/minute, le surnageant recueilli constituant le liquide à inoculer; 2 à 3 ml de ce surnageant sont injectés en de nombreux points dans la muqueuse linguale de deux ou trois moutons. Vingt à vingt-quatre heures plus tard, les parois et la lymphe des aphtes bien développés sont récoltées. Ce matériel virulent, traité comme les aphtes bovins, servira à inoculer le passage suivant. Après un certain nombre de passages (10 pour le virus "C Vosges 60", 6 pour la souche "A Allier 60", 1 pour la souche "O Espagne 64", 5 pour la souche "O Flandres"), nous observons une virémie chez la totalité des moutons, bien qu'une partie seulement présente des lésions de généralisation.

Le troisième ou le quatrième passage après apparition régulière de la virémie servira à la préparation du virus d'épreuve. Notons que des aphtes primaires d'inoculation apparaissent toujours quand l'injection est faite par la voie intradermolinguale.

B. Préparation du virus d'épreuve

Les aphtes linguaux des moutons inoculés avec le dernier passage sont broyés dans du milieu de Hanks additionné d'hydrolysat de lactalbumine, puis centrifugés (1 gramme d'aphtes pour 9 ml de milieu). Le surnageant est dilué dans une certaine quantité de milieu de Hanks-Lactalbumine et sert à ensemencer une culture primaire de cellules rénales de mouton. Vingt à vingt-quatre heures plus tard, l'effet cytopathogène étant complet, le liquide de culture est congelé après répartition en flacons dont chacun servira pour une épreuve. Ce liquide est titré sur culture de cellules primaires de rein de porc.

C. Contrôle de la virémie

Un échantillon de sang est prélevé, à la veine jugulaire, sur le liquide anticoagulant d'Alsever. Ce sang est aussitôt centrifugé et 4 à 6 tubes de culture de cellules rénales de porc sont ensemencés, chacun avec 2 gouttes de plasma. L'effet cytopathogène éventuel du virus aphteux est contrôlé après 24, 48 et 72 heures et la nature du virus confirmée par la réaction de fixation du complément.

D. Souches de virus

Ont été employées dans l'expérimentation une souche de type "C", une souche de type "A" et deux souches de type "O" :

Virus "C Vosges 60" :	isolé en 1960 dans un foyer du département des Vosges,
Virus "A Allier 60" :	isolé en 1960 dans le département de l'Allier,
Virus "O Espagne 64" :	isolé en 1964 à la frontière franco-espagnole,
Virus "O Flandres" :	nous a été remis en 1959 par le Professeur Willems, de Bruxelles.

4. Contrôle de l'immunité par épreuve virulente

A. Vaccination

Le vaccin est injecté par voie sous-cutanée au pli de l'ars. Pour une vaccination à dose fixe (tableau no 3), le vaccin est inoculé pur. Pour l'établissement d'une dose vaccinante 50 % (DVM 50), il est toujours inoculé sous un volume constant de 1,6 ml pour les vaccins monovalents, et de 5 ml pour les vaccins trivalents, mais en dilution dans un tampon inerte de formule :

$Na_2 CO_3$	0,530 grammes
$NaH CO_3$	16,800 grammes
Na Cl	85 grammes
Eau distillée	10 litres.

Ainsi que nous l'avons déjà exposé (13), nous préférons ne pas employer de diluant contenant des substances adjuvantes de l'immunité, afin de juger exactement de la valeur intrinsèque d'un vaccin. Avant vaccination et épreuve, du sérum est prélevé pour rechercher les anticorps par séroneutralisation sur cellules primaires de rein de porc (8, 9).

B. Epreuve virulente

Chaque mouton reçoit, par la voie intradermolinguale, 10 000 DECP 50 * du virus préparé sur cellules rénales de mouton, ainsi qu'il a été exposé plus haut Ces 10 000 DECP 50, sous un volume total de 1 ml, sont inoculées en une vingtaine de points.

La température des moutons est notée quotidiennement, mais l'expérience a montré qu'il était difficile d'en tenir compte pour l'interprétation des résultats.

C. Lecture

Des échantillons de sang sont prélevés 24 et 48 heures après inoculation afin de vérifier la présence ou l'absence de virus dans le plasma. Les prélèvements de 48 heures ne sont pas effectués sur les moutons dont la virémie s'est révélée positive 24 heures après inoculation.

Dans la première partie de notre travail, un prélèvement complémentaire 96 heures après inoculation était effectué, mais nous nous sommes rapidement aperçus de son inutilité. En effet, des études de la virémie publiées par ailleurs, et les tableaux 1 et 2 montrent que la virémie, quand elle existe, est toujours présente à 24 ou à 48 heures.

5. Contrôle par titrage des anticorps

Le sang récolté avant vaccination et avant épreuve virulente est centrifugé et le sérum est recueilli en vue du titrage des anticorps. Le sérum à titrer est dilué selon une progression géométrique de raison 1/2, dans du milieu de Hanks additionné de lactalbumine (pH : 7). Le virus d'épreuve est décongelé et dilué à 100 DECP 50 par millilitre. Un millilitre de chaque dilution de sérum est alors mélangé avec un millilitre de la suspension virulente. Le mélange est laissé 2 heures 30 à la température du laboratoire et agité toutes les 30 minutes. Ensuite , on inocule 0,2 ml de chaque mélange sur les tubes de culture monocellulaire de cellules primaires de rein de porc, contenant déjà 1,8 ml de milieu lactalbumine-Hanks, additionné de 1 % de sérum de veau inactivé et exempt d'anticorps antiaphteux. Les tubes sont alors portés à l'étuve à 37°C sur des tambours roulants et l'effet cytopathogène est vérifié 72 heures plus tard.

---

* DECP 50 = dose effet cytopathogène 50%

Nombre d'heures après inoculation intradermolinguale	Moutons							
	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6	n° 7	n° 8
10				2,5				1,8
22				2,8				2,8
24	3,2	1,5	3,6		2,2	2,6	5,2	
28				4,4				2,5
34				>4,5				2,8
45				4,2				3,4
48	3,75	0,8	3,5		1,5	1,5	4,4	
72	<0,5	<0,5			<0,5	<0,5		
96	<0,5	1			<0,5	0,8		

Tableau n° 1 : virémie - Titrage de l'infectivité du plasma de moutons non vaccinés après inoculation virulente (log. DECP 50/ml).

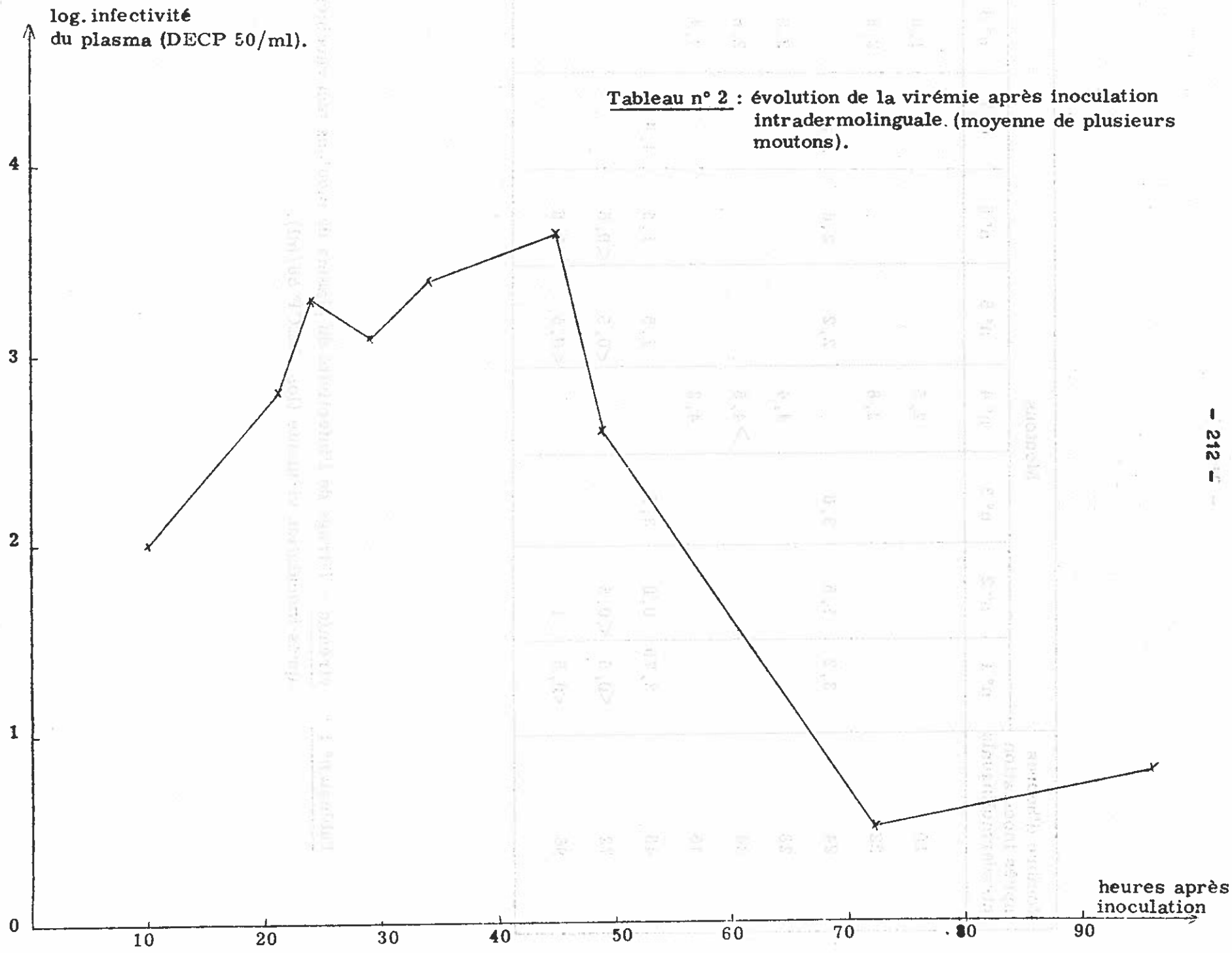


Tableau n° 2 : évolution de la virémie après inoculation intradermolinguale. (moyenne de plusieurs moutons).

Chaque série de séroneutralisation est accompagnée de tubes témoins :

- titrage du virus qui permet de vérifier si les tubes de culture sont bien ensemencés avec 10 DECP 50 pour le titrage des sérums;
- témoins sérums : ces tubes sont ensemencés avec le sérum pur, sans virus et permettent de vérifier sa toxicité éventuelle;
- témoins milieux : ces tubes ne reçoivent ni sérum, ni virus;
- titrage d'un sérum référence, ce qui permet de vérifier des anomalies éventuelles dans la réaction.

6. Cellules utilisées

Les virus d'épreuve sont produits sur cellules rénales primaires de mouton. Pour les titrages et les vérifications de virémie, ce sont des cellules rénales primaires de porc qui sont utilisées.

II. RESULTATS

1. Contrôle de la vaccination

Ainsi que nous l'avons déjà souligné dans l'introduction, l'irrégularité des lésions chez les moutons inoculés nous a amenés à vérifier l'infection aphteuse par la recherche de la virémie. Nous avons donc considéré que tout mouton, chez lequel on ne trouvait pas de virus dans le sang après inoculation, était immunisé alors qu'au contraire, l'animal n'était pas protégé si son sang se révélait virulent. Un contrôle supplémentaire nous a été apporté par le titrage des anticorps avant et après vaccination.

Les tableaux no 3, 4, 5 et 6 rassemblent les résultats obtenus après vaccination monovalentes ou trivalentes.

A. Recherche de la virémie

Le tableau no 3 rapporte les résultats d'une épreuve qualitative après vaccination trivalente, le tableau no 4 de deux épreuves quantitatives d'un vaccin monovalent de type "C", le tableau no 5 d'un vaccin trivalent de types "O", "A" et "C", et le tableau no 6 d'un vaccin trivalent et de ses constituants monovalents.

L'examen de ces tableaux montre que :

- avec une dose vaccinale suffisante, les moutons sont parfaitement protégés contre l'apparition de la virémie,
- les moutons témoins, non vaccinés, présentent pratiquement tous une virémie après inoculation,
- la proportion des animaux dans le sang desquels on retrouve du virus après infection, augmente à mesure que la dose de vaccin diminue,
- il est donc possible de protéger par vaccination les moutons de l'infection aphteuse.

B. Titrage des anticorps

L'examen des tableaux no 4, 5 et 6 indique que :

- une vaccination à dose suffisante provoque l'apparition d'anticorps circulants,

Durée de la vaccination avant épreuve	Numéros des moutons	VIREMIE			
		Nombre d'heures après épreuve			
		24 h	48 h	72 h	96 h
14 jours	895 vacciné		0	0	
	896 "		0	0	
	897 "		0	0	
	898 "		0	0	
	271 témoin		0	0	
	272 "		0	+	
	273 "		+	+	
	274 "		+	+	
	275 "		+	+	
28 jours	882 vacciné	0	0	0	0
	885 "	0	0	0	0
	887 "	0	0	0	0
	888 "	0	0	0	0
	891 "	0	0	0	0
	892 "	0	0	0	0
	893 "	0	0	0	0
	276 témoin	+	+	+	0
	277 "	+	+	+	0
	278 "	+	+	+	0
	279 "	+	+	0	0
	280 "	+	+	+	0
35 jours	881 vacciné	0	0	0	0
	883 "	0	0	0	0
	886 "	0	0	0	0
	889 "	0	0	0	0
	894 "	0	0	0	0
	899 "	0	0	0	0
	900 "	0	0	0	0
	288 témoin	+	+		
	229 "	+	+		
	230 "	0	+		
	231 "	+	+		
	232 "	0	0		

Tableau n° 3 : Vaccin F 4519 O-A-C, de production courante, chaque mouton étant vacciné avec 1/3 de dose moyenne bovine. Epreuve avec 10 000 DECP 50 de virus "C Vosges 60".

Légende : virémie + = présence de virus,
virémie 0 = absence de virus.

Première épreuve (virus C Vosges 60)			Seconde épreuve (virus C Vosges 60)		
Doses de vaccin (en ml)	Nombre de moutons (*)	Titre moyen d'anticorps	Doses de vaccin (en ml)	Nombre de moutons (*)	Titre moyen d'anticorps
0,006	7/8	< 0,4	0,006	6/6	< 0,4
0,025	1/8	< 0,4	0,012	6/7	< 0,4
0,1	0/8	0,8	0,025	3/7	⩽ 0,7
0,4	0/8	1,15	0,050	0/7	0,8
1,6	0/8	1,5			
témoins	10/10	⩽ 0,4	témoins	7/7	⩽ 0,26
DVM 50 = 0,012 ml			DVM 50 = 0,021 ml		

Tableau n° 4 : résultat de deux épreuves un mois après vaccination.

Vaccin F 5319 mono "C" (dose moyenne bovine = 1,6 ml)

- DVB 50 : 0,20 ml (soit puissance moyenne = $\frac{1,6 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}}$ = 8),
- DVC 50 : 0,13 ml (soit puissance moyenne = $\frac{1,6 \text{ ml}}{0,13 \text{ ml}}$ = 12).

(*) $\frac{\text{nombre de moutons avec virémie positive}}{\text{nombre total de moutons}}$

Tableau n° 5 : épreuves 20 jours après vaccination

Epreuve	C VOSGES 60		O FLANDRES		A ALLIER 60	
Doses (en ml) *	virémie	anticorps C	virémie	anticorps O	virémie	anticorps A
0,006	4/5	⩽ 0,4	5/7	0,5		
0,012	7/7	⩽ 0,3	3/6	0,6	4/5	⩽ 0,35
0,025	5/7	⩽ 0,4			3/6	⩽ 0,5
0,05	3/6	⩽ 0,27	2/7	0,78	0/6	0,75
0,1	2/6	0,48	1/6	0,93	1/7	
0,2	0/7	0,60	0/7	1,05	1/6	0,76
0,4					0/7	0,86
témoins	6/6	⩽ 0,18	6/6	0,33	6/6	⩽ 0,23
DVM 50	0,054 ml *		0,021 ml *		0,034 ml *	

		DVB 50 (*)	DVC 50
Vaccin E 2067 trivalent O-A-C	- épreuve "O Flandres"	0,15 ml	
	- épreuve "A Allier 60"	0,59 ml	
	- épreuve "C Vosges 60"	0,32 ml	
Composition : mélange à parties égales de			
	- F 1119 mono "O Flandres"	0,10 ml	0,10 ml
	- F 5220 mono "A Allier 60"	0,62 ml	0,06 ml
	- F 5319 mono "C Vosges 60"	0,20 ml	0,13 ml

(*) exprimé en volume de vaccin monovalent contenu dans le trivalent.

Tableau n° 6 épreuve 20 jours après vaccination

épreuve	C VOSGES 60			O FLANDRES		O ESPAGNE 64		A ALLIER 60	
VACCIN	F 5338		E 2125	F 5140		F 5145	E 2125	F 5245	
Doses *	virémie	anticorps	virémie	virémie	anticorps	virémie	virémie	virémie	anticorps
0,003	7/8	⩽ 0,18	7/8	7/8	⩽ 0,30	6/8	7/8	2/8	⩽ 0,41
0,012	6/10	⩽ 0,30	7/10	6/10	⩽ 0,30	1/10	7/10	0/10	0,73
0,05	4/10	⩽ 0,38	0/8	7/10	⩽ 0,35	1/10	0/8	0/10	0,80
0,2	0/8	0,72	1/7	1/8	0,68	0/8	1/7	0/8	1,38
témoins	3/3	0,40	5/6	2/2	⩽ 0,35	6/6	5/6	4/4	0,30
DVM 50	0,019 ml		0,014 ml *	0,026 ml		0,008 ml	0,014 ml *	< 0,003 ml	

	DVC 50 *	DVB 50 *
Vaccin E 2125 trivalent O-A-C		
- épreuve "O Flandres"	0,11 ml	
- épreuve "O Espagne 64"	0,05 ml	
- épreuve "C Vosges 60"	0,17 ml	0,15 ml
- épreuve "A Allier 60"	0,05 ml	0,20 ml
Composition : mélange de - 1/2 volume F 5140 mono "O Flandres	0,28 ml	0,20 ml
- 1/2 volume F 5145 mono "O Espagne 64"	0,06 ml	0,31 ml
- 1 volume F 5338 mono "C Vosges 60"	0,07 ml	0,20 ml
- 1 volume F 5245 mono "A Allier 60"	0,045 ml	0,20 ml

* dose en ml de vaccin monovalent correspondant à l'épreuve.

- les animaux neufs ne présentent pas d'anticorps antiaphteux mesurables avec notre méthode,

- la quantité d'anticorps cirulants augmente avec la dose de vaccin inoculée.

Si les moutons sont classés en fonction du titre d'anticorps circulants par rapport à la présence ou à l'absence de virémie, on obtient le classement rapporté sur le tableau no 7 et le graphique no 8.

Notre méthode de titrage est peu sensible et peu fidèle au-dessous d'un titre de 0,4 à 0,5 (titre exprimé en log. de la dilution de sérum) ce qui interdit de déterminer avec précision le taux d'anticorps moyen correspondant à la DVM 50 (doses vaccinantes 50% du mouton).

De ces résultats, on peut cependant déduire qu'un titre d'anticorps sérique inférieur à 0,15 correspond à un animal sûrement sensible, un titre d'anticorps supérieur à 0,5 à un animal presque sûrement protégé et un titre supérieur à 0,75 à un animal sûrement protégé.

2. Durée de l'immunité après vaccination

Des groupes de moutons vaccinés avec des doses variables d'un vaccin monovalent "C" sont éprouvés 1 mois, 2 mois, 3 mois, 4 mois et 6 mois après vaccination (tableau no 9). Les résultats montrent qu'avec une dose correspondant à 1/4 de dose bovine, la protection est encore correcte 5 à 6 mois après vaccination. L'évolution de la DV 50 du mouton dans le temps a été étudiée statistiquement par calcul en probits et titre-temps.

Calcul des paramètres en probits

Chaque relation dose-effet, pour un temps donné, est une droite dont la formule est (1) $R = p \log. D + e$:

(R = probit du pourcentage de protection,
)
(p = pente de la droite probits.

Nous référant à l'analyse du titre-temps de Béranger et Joubert, la formule (1) se décompose en :

(2) $p = a \log. t + b$

(3) $e = c \log. t + d$

soit la formule développée :

(4) $R = (a \log. t + b) \log. D + (c \log. t + d)$.

Les coefficients a, b, c et d ont été calculés suivant les données expérimentales du tableau no 10.

virémie: +	127	9	22	1	1	0	0	0	0	0
virémie: 0	5	7	33	34	21	25	16	11	13	13
titres d'anticorps	0 à 0,15	0,15 à 0,30	0,30 à 0,45	0,45 à 0,60	0,60 à 0,75	0,75 à 0,90	0,90 à 1,05	1,05 à 1,20	1,20 à 1,35	1,35 à 1,50
pourcentage de protection	3,8	43,8	60	97,2	95,5	100	100	100	100	100

Tableau n° 7 : Pourcentage de protection en fonction du titre d'anticorps sériques antiaphteux.

Ce tableau a été établi par addition des résultats d'inoculation de moutons vaccinés ou non.

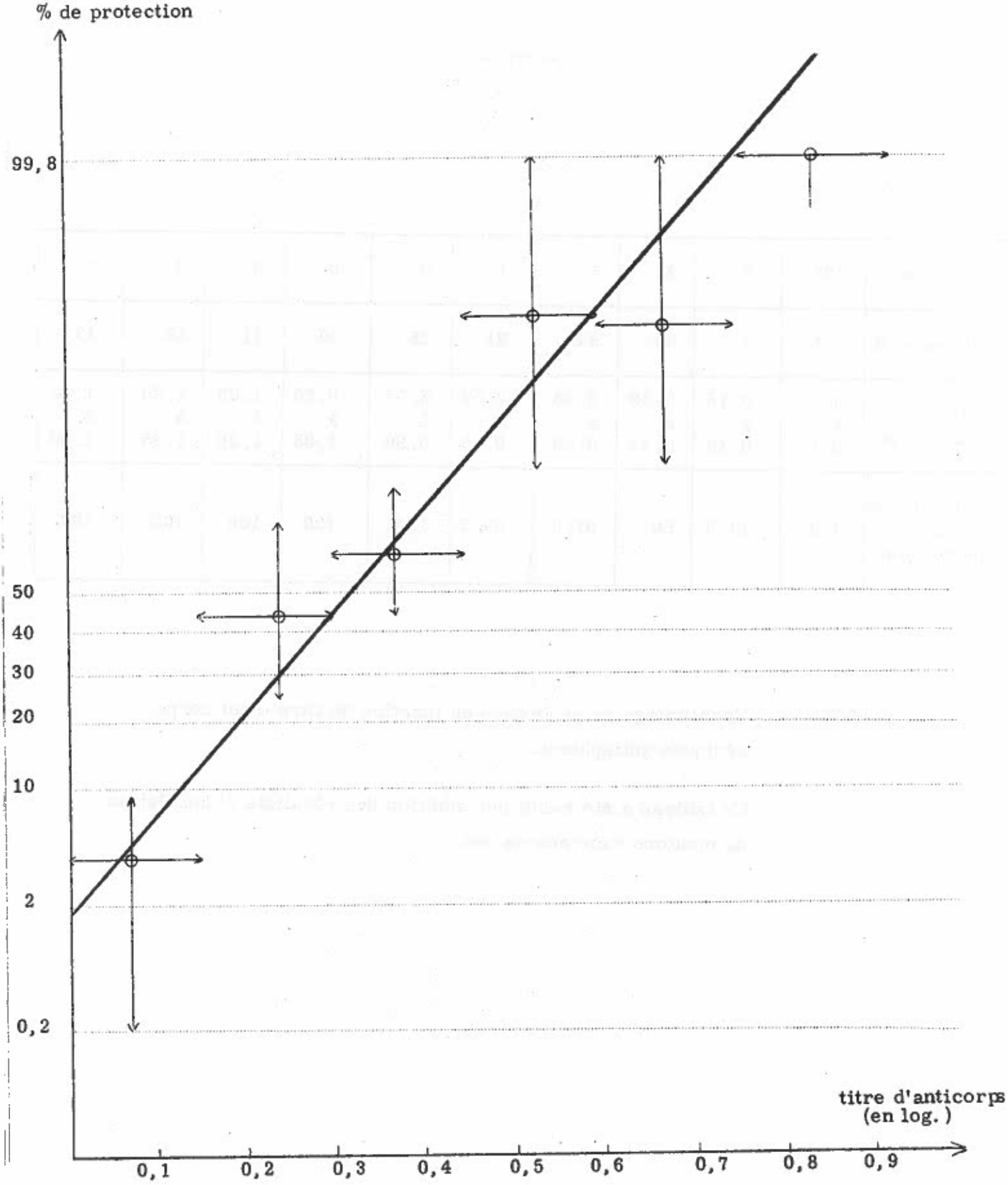

% de protection
99,8
50
40
30
20
10
2
0,2
titre d'anticorps
(en log.)
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9

Tableau n° 8.

Durée d'immunité	1 mois		2 mois		3 mois		4 mois		6 mois	
Doses (en ml)	(*) virémie	(**) moyenne anticorps	virémie	moyenne anticorps	virémie	moyenne anticorps	virémie	moyenne anticorps	virémie	moyenne anticorps
0,006	6/6	⩽ 0,35	7/7	⩽ 0,45						
0,012	6/7	⩽ 0,40	5/7	⩽ 0,45	8/8	⩽ 0,16	5/5	⩽ 0,15		
0,025	3/7	⩽ 0,70	4/7	⩽ 0,50	3/7	⩽ 0,28	5/7	⩽ 0,20	6/8	⩽ 0,22
0,05	0/7	0,80	2/7	0,90	3/8	⩽ 0,31	1/6	0,30	3/8	⩽ 0,38
0,1			0/7	1,05	2/8	⩽ 0,40	0/7	0,39	3/7	⩽ 0,37
0,2					1/9	0,71	2/7	0,67	1/6	0,56
0,4									2/10	0,70
Témoins	7/7	⩽ 0,40	7/7	< 0,26	7/7	⩽ 0,15	3/3	⩽ 0,25	10/10	⩽ 0,15
DVM 50	0,021 ml		0,025 ml		0,047 ml		0,031 ml		0,06 ml	

(*) $\frac{\text{nombre de moutons avec virémie positive}}{\text{nombre total de moutons}}$

(**) exprimé en logarithme de la dilution de sérum

Tableau n° 9 : épreuve d'un vaccin monovalent "C" (n° 5319) - durée de l'immunité.

TABLEAU 10

Temps	log.D 50	σ D 50	D 50(10^{-3}ml)	p	σ p	Equation : R = p log. D + e (1)
1 mois	1,234	0,07	17	3,54	0,93	R = 3,54 log. D + 0,63
2 mois	1,428	0,12	26,8	2,24	0,97	R = 2,24 log. D + 1,80
3 mois	1,55	0,13	35,5	1,755	0,595	R = 1,755 log. D + 2,28
4 mois	1,60	0,15	40	1,853	0,71	R = 1,853 log. D + 2,03
6 mois	1,75	0,20	56	1,097	0,497	R = 1,097 log. D + 3,08

Selon le processus statistique proposé par Beranger et Joubert, nous avons :

a = -2,61
b = 3,22
c = 2,59
d = 0,85

Les formules (2), (3) et (4) s'écrivent :

p = -2,61 log. t + 3,22
e = 2,59 log. t + 0,85
R = (-2,61 log. t + 3,22) log. D + (2,59 log. t + 0,85).

Nous pouvons calculer les équations théoriques des droites dose-effet en remplant "t" par sa valeur (tableau no 11).

TABLEAU 11

Temps	Equation théorique	Equation expérimentale
1 mois	R = 3,22 log. D + 0,85	R = 3,54 log. D + 0,63
2 mois	R = 2,44 log. D + 1,62	R = 2,24 log. D + 1,80
3 mois	R = 1,97 log. D + 2,09	R = 1,75 log. D + 2,28
4 mois	R = 1,65 log. D + 2,41	R = 1,85 log. D + 2,03
6 mois	R = 1,18 log. D + 2,87	R = 1,097 log. D + 3,08

L'équation générale de R est l'équation d'un système de droites convergentes en un point C (tableau no 12) dont les coordonnées sont :

$$\begin{cases} R = 4{,}04 \pm 0{,}55 \ * \\ \log. D = 0{,}99 \end{cases}$$

---

* probabilité 0,95

Le calcul des DV 50 théoriques dont les valeurs sont reportées graphiquement sur le tableau no 13 s'effectue en remplaçant R = 5 (probit de 50%), donc :

	log DV 50 théorique	log. DV 50 expérimentale
1 mois	1,29	1,23
2 mois	1,39	1,43
3 mois	1,50	1,55
4 mois	1,58	1,60
6 mois	1,81	1,75

Nous pouvons calculer les estimations de la précision sur le log. DV 50 et p. (les calculs peuvent être mis à la disposition des lecteurs qui en émettraient le désir).

Ce modèle statistique théorique englobe parfaitement les résultats expérimentaux; aucun point expérimental ne se trouve hors des limites du système proposé.

L'augmentation de la dose vaccinante 50 % (DV 50) en fonction du temps montre l'importance de la notion de "puissance d'un vaccin" qui peut se définir comme le nombre de doses vaccinantes 50 % contenues dans une dose.

Plus la puissance d'un vaccin, donc sa qualité, sera élevée, plus longue sera la durée de l'immunité. C'est ainsi que pour protéger 95 % des animaux pendant 3 mois, il faut une dose de vaccin correspondant à 10 DVM 50 (valeur obtenue par épreuve des animaux un mois après vaccination), alors que pour obtenir le même pourcentage de protection durant 6 mois, il faut près de 100 DVM 50 (tableau no 12). Ceci confirme bien la nécessité d'une définition exacte des normes de contrôles à adopter pour les vaccins antiaphteux.

Lorsque, comme c'est le cas pour les contrôles courants (10), c'est l'immunité immédiate qui est mesurée, il faut exiger une puissance élevée pour obtenir une durée de l'immunité acceptable. De tels vaccins protègeront les animaux plus longtemps et c'est une des raisons pour laquelle l'emploi de vaccins de haute qualité est nécessaire pour le succès d'une prophylaxie généralisée de la fièvre aphteuse.

3. Durée d'immunisation

Le tableau no 14 montre que l'immunité s'installe très vite et solidement, avec présence d'anticorps circulants, 7 jours après la vaccination.

III. CONCLUSIONS

La vérification de l'infection aphteuse du mouton par recherche de la virémie a permis une étude systématique de la vaccination antiaphteuse de cet animal. Le titrage des anticorps sériques présents dans le sérum des animaux protégés confirme la valeur de cette méthode.

Nous avons pu ainsi montrer qu'avec les doses de vaccin utilisées dans la pratique (1/3 à 1/4 de la dose bovine), la vaccination monovalente ou trivalente est possible et que la protection obtenue est correcte.

Par la mesure des doses vaccinantes 50% chez le bovin et le mouton des mêmes vaccins, nous arrivons aux conclusions suivantes :

Après 20 jours d'immunisation, le mouton a une dose vaccinante 50%, en moyenne, 20 fois plus faible que la même dose vaccinante 50% établie après 20 jours d'immunisation chez le bovin.

Après 28 jours d'immunisation, le mouton a une dose vaccinante 50%, en moyenne, 13 fois plus faible que le bovin 20 jours après immunisation.

La comparaison des doses vaccinantes 50% établies respectivement chez le boeuf et le mouton n'autorise cependant pas les mêmes conclusions pour les hauts pourcentages de protection. En effet, la pente des courbes dose-effet n'est pas la même chez ces deux espèces et la différence des doses bovines et ovines sera beaucoup moins considérable pour 95% de protection par exemple. C'est pourquoi il est prudent de maintenir, dans la pratique, une dose de vaccin 3 à 4 fois plus faible pour le mouton que pour le bovin.

Une étude de la durée de l'immunité après vaccination montre, qu'aux doses habituelles (1/3 de la dose bovine), une primo-vaccination protège correctement les animaux pendant 5 à 6 mois. La mesure des valeurs des doses vaccinantes 50% chez le mouton (DVM 50) un, deux, trois, quatre et six mois après vaccination, met en évidence l'augmentation importante de la valeur de cette DVM 50 au cours du temps.

Seul un vaccin de très haute qualité conférera donc aux animaux une durée d'immunité satisfaisante. C'est ainsi qu'avec une dose de vaccin équivalant à 10 DVM 50 (établies par épreuve un mois après vaccination), la protection est de 95% 3 mois après vaccination et de 50% après neuf mois. Ceci souligne l'importance de la puissance du vaccin pour le succès d'une prophylaxie généralisée.

La durée d'immunisation est très courte puisque les animaux sont protégés correctement une semaine après la vaccination.

La présence de virus circulant dans le sang d'animaux ne présentant pas de lésions aphteuses macroscopiques souligne le rôle de porteur inapparent que peut jouer le mouton dans la propagation des épizooties de fièvre aphteuse.

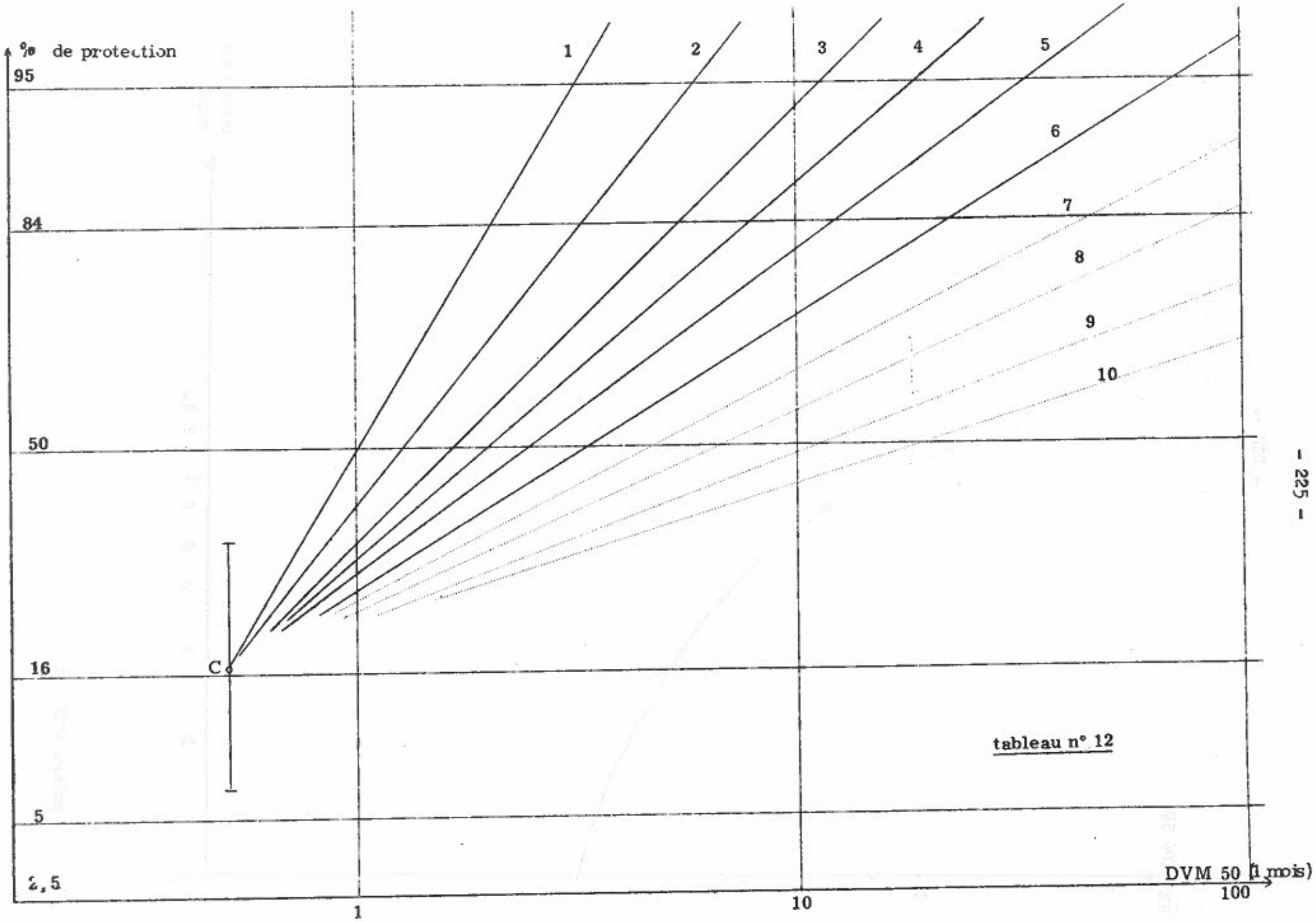

% de protection
95
84
50
16
5
2,5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
C
1
10
100
DVM 50 (1 mois)

tableau n° 12

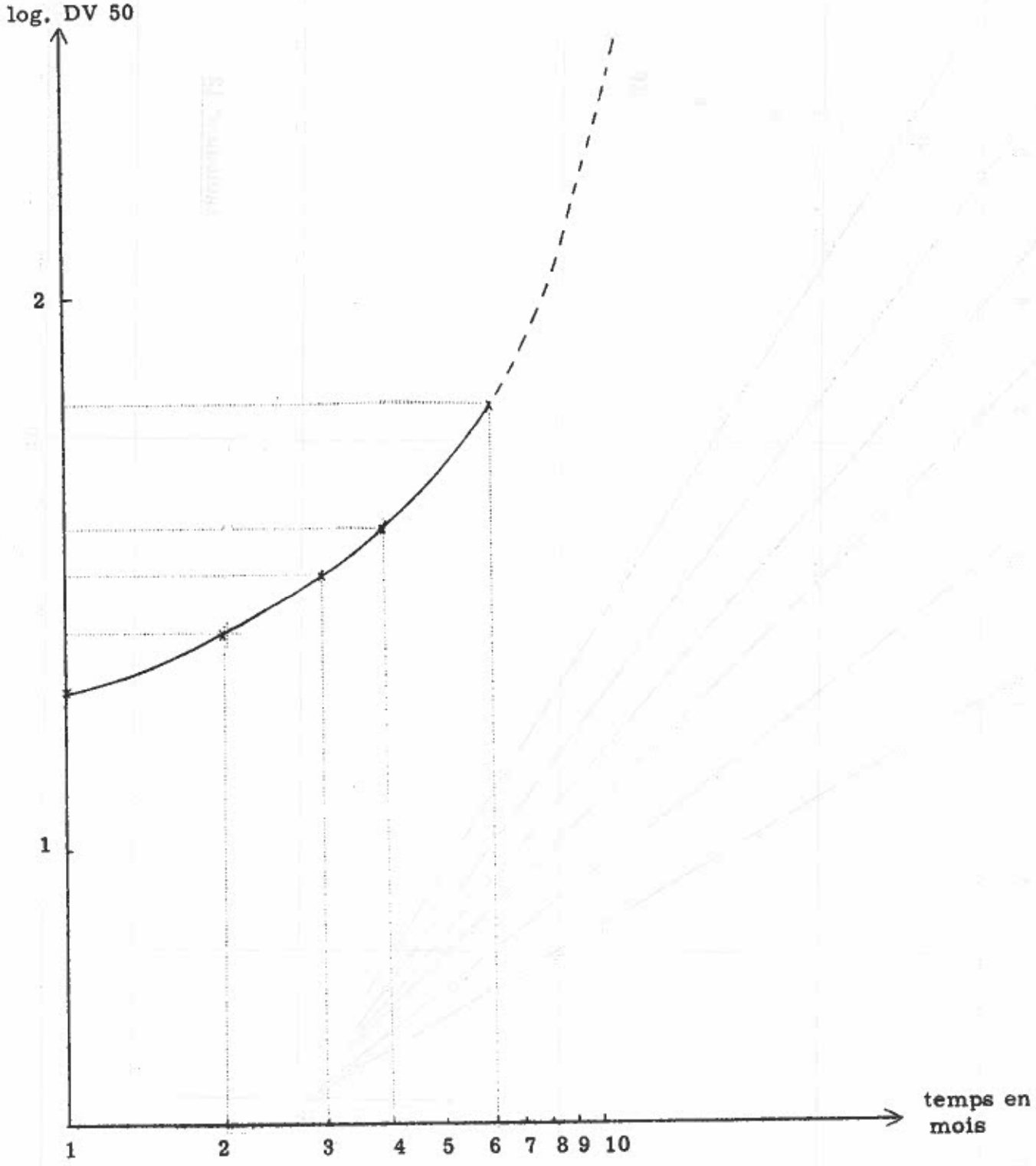


Tableau n°13

Vaccin 2102 O-A-C : épreuve O Flandres

Nbre de jours après vaccination	7 jours		14 jours		21 jours		28 jours	
Doses (en ml)	virémie	anticorps	virémie	anticorps	virémie	anticorps	virémie	anticorps
0,003	8/8	< 0,27	4/8	≤ 0,41	6/8	0,36	6/8	≤ 0,23
0,012	2/10	≤ 0,59	5/10	≤ 0,53	4/10	0,40	7/10	0,28
0,05	1/10	0,68	2/10	0,92	3/10	0,65	4/10	0,54
0,2	0/8	≥ 1,12	0/8	1,05	0/8	1,12	0/8	1,22
témoins	5/6	0,26	6/6	< 0,26	6/6	< 0,15	5/6	≤ 0,22
DVM 50	0,019 ml (*)		0,014 ml (*)		0,0125 ml (*)		0,0187 ml (*)	

		DVB 50	DVC 50 (*)
Vaccin E 2102 trivalent O-A-C	- épreuve "O Flandres"	0,17 ml	0,26 ml
	- épreuve "A Allier 60"	0,20 ml	0,09 ml
	- épreuve "C Vosges 60"	0,34 ml	0,25 ml
Composition : mélange à parties égales de :			
	- F 5132 mono "O Flandres"	0,08 ml	0,23 ml
	- F 5233 mono "A Allier 60"	0,15 ml	0,09 ml
	- F 5324 mono "C Vosges 60"	0,43 ml	0,27 ml

(*) exprimé en volume de vaccin monovalent contenu dans le trivalent.

Tableau n° 14

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. Europ. de Lutte contre la Fièvre Aptheuse, F.A.O., Lyon,
28 septembre-1er 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. DELPY L.
Au sujet de l'immunisation des moutons contre la clavelée et la fièvre aphteuse.
Bull. Acad. Vet. Franc, 32, (1), 1959, p. 69-74.

5. FONTAINE J., DUBOUCLARD C., BORNAREL P.
Vaccination antiaphteuse du mouton. Recherche d'une méthode de contrôle de l'immunité.
Bull. O.I.E., 65, 1966, p. 195-212.

6. GIRARD H.C., CHARUTAMRA U., CHOONPICHARNA P.
Passages en série du virus aphteux Asia I.
Bull. O.I.E., 51, (7-8), 1959, p. 361-368.

7. KHANKISHIEV A.M., GADZHIEV K.S., ALEKPERCV Y.G.
La fièvre aphteuse chez les agneaux nouveau-nés.
Veterinariya Moscow, 35, (9), 1958, p. 59-60.

8. MACKOWIAK C., LANG R., FONTAINE J., CAMAND R., PETERMANN H.G.
Rapport sur le contrôle du vaccin antiaphteux. Application à ce contrôle de la séroneutralisation sur cellules rénales.
5ème Cong. Stand. Biol. Jérusalem, 13-20 septembre 1959.

9. MACKOWIAK C., LANG R., FONTAINE J., CAMAND R., PETERMANN H.G.
Relation entre titre d'anticorps neutralisants et protection des animaux après vaccination antiaphteuse.
Ann. Inst. Pasteur, 103, (2), 1962, p. 252-261.

10. MACKOWIAK C., FONTAINE J., TERRE J., STELLMANN C., ROUMIANTZEFF M., PETERMANN H.G.
Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. Etude de la loi dose-effet et corrélation entre les doses vaccinantes 50% chez les cobayes et les bovidés.
Réunion Comm. Europ. de Lutte contre la Fièvre Aphteuse, FAO., Lyon
28 septembre-1er octobre 1965.
Bull. O.I.E., 65, 1966, p. 131-171.

11. PLACIDI L., SANTUCCI J., HAAG J., SENDRAL R.
Vaccination simultanée du mouton marocain contre la clavelée et la fièvre aphteuse.
Bull. Acad. Vét. France, 31, (7), 1958, p. 351-355.

12. RIVENSON 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.

13. ROUMIANTZEFF M., FONTAINE J., STELLMANN C., MACKOWIAK C.
Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. I - Détermination de la dose vaccinante 50% chez le cobaye.
Rev. Méd. Vét., 116, (8-9), 1965, p. 597-607.

14. TERRE J., BORNAREL P., STELLMANN C., SOULEBOT J.P.
Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. Détermination de la dose vaccinante 50% chez le bovin.
Rec. Méd. Vét. Alfort, 141, 1965, p. 1109-1130.

15. 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).

16. WYNHOHRADNYK V., POPOVICI V.
Méthode de fication du complément pour la mise en évidence des anticorps fixateurs dans le sérum d'animaux convalenscents de fièvre aphteuse ou vaccinés.
Bull. O.I.E., 55, 1961, p. 1448-1464.