

Etude sérologique comparative des principales souches de virus aphteux isolés en Ethiopie de 1969 à 1974

par J. L. MARTEL (*)
(avec la collaboration technique de C. GALLON (*)

RESUME

Dans une note précédente, l'inventaire des types de virus aphteux isolés en Ethiopie a été présenté. Mais la notion de type étant insuffisante, nous avons cherché à mettre en évidence l'existence éventuelle de variantes au sein de chaque type O, A et C des souches éthiopiennes dont nous disposons. Nous avons utilisé une technique sérologique de fixation du complément quantitative de semi-précision. Compte tenu des limites de cette méthode, un premier tri sérologique des souches éthiopiennes a pu être fait. Ce tri sérologique constitue une étape préliminaire indispensable pour orienter les études immunologiques ultérieures.

INTRODUCTION

Dans une note précédente (8) nous avons précisé que seuls les types O, A et C de virus aphteux ont été isolés à ce jour en Ethiopie.

Mais l'étude épidémiologique complète de la fièvre aphteuse dans une région donnée ne saurait se contenter d'un simple inventaire des types de virus isolés. En effet, dans le cadre d'un même type, les souches de virus aphteux montrent quelques différences dans leur comportement antigénique (11, 12).

Actuellement les méthodes de sérologie et d'immunologie quantitatives permettent de distinguer un nombre important de variantes à l'intérieur d'un même type (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10). Cette distinction a un intérêt pratique majeur : elle constitue l'élément essentiel du choix des souches utilisées pour la préparation et le contrôle des vaccins antiaphteux.

Une telle étude épizootologique a été commencée par une équipe de vétérinaires du Laboratoire Roger Bellon (1) avec les premières souches de type O et A isolées en Ethiopie jusqu'au premier semestre 1971. Cette première étude, assez avancée pour le type A, n'avait été qu'ébauchée pour le type O, et l'étude du type C n'avait pas pu être abordée faute d'isolement de virus de ce type à l'époque.

Nous avons repris ce travail en élargissant l'éventail des souches, mais en nous limitant par contre, pour des raisons matérielles, à l'aspect sérologique.

MATERIEL ET METHODE

A) Principe

Nous avons titré, par fixation du complément, les anticorps antiaphteux préparés par hyperimmunisation de cobayes avec les diverses souches de virus aphteux à notre disposition.

(*) Imperial Veterinary Institute et Mission Vétérinaire Française en Ethiopie, P.O.B. 19, Debré-Zeit, Ethiopie.

Ces titrages ont été réalisés en présence d'une part des antigènes correspondants (titre homologue) et d'autre part en présence des autres antigènes de même type (titres hétérologues).

Les rapports entre les titres homologues et les titres hétérologues caractérisent les relations sérologiques entre les souches.

B) Les éléments de la réaction sérologique

1. *Le sérum hémolytique* de lapin antihématies de moutons est celui du commerce.

2. *Les hématies de moutons* proviennent des moutons locaux. Elles sont utilisées après avoir été lavées trois fois dans du tampon phosphate isotonique.

3. *Le complément* utilisé est du complément lyophilisé du commerce, que l'on reconstitue avec du tampon acide borique-acétate.

4. *Les sérums hyperimmuns* ont été préparés sur cobayes selon la technique décrite dans la publication précédente (8).

Les sérums hyperimmuns correspondant aux souches européennes nous ont été fournis par le Laboratoire Roger Bellon.

5. *Les antigènes* sont préparés sur cultures cellulaires en flacons roulants de la lignée IB RS 2, à partir des souches de virus isolés en

Ethiopie. La liste des souches retenues pour cette étude est présentée dans le tableau n° I. Nous avons fait ce choix en fonction de critères chronologiques et géographiques.

Le virus est utilisé si possible dès le troisième passage sur culture cellulaire pour éviter au maximum toute variation par rapport au virus sauvage. La récolte est clarifiée par centrifugation, mais le virus n'est pas inactivé. Dans la plupart des cas, les antigènes ainsi préparés fixent complètement le complément au moins jusqu'au 1/8 lorsqu'ils sont mis en présence du sérum homologue.

Les antigènes d'origine européenne nous ont été fournis par le Laboratoire Roger Bellon après inactivation.

C) La réaction sérologique

1. Choix de la technique

La réaction de fixation du complément utilisée est du type Kolmer à 100 p. 100 d'hémolyse, manuelle, en tube (3).

Cette technique est quantitative : le complément est utilisé à la dilution limite donnant 100 p. 100 d'hémolyse lors du titrage en présence de l'antigène seul [c'est-à-dire une unité hémolytique au lieu de deux comme dans la technique qualitative de typage (8)].

TABLEAU N° I - Liste des souches éthiopiennes étudiées.

Type	Lieu d'isolement	Province	Epoque du foyer	N° référence ⁺
O	Ghinda	Erythrée	1969	22
	Shola	Centre Shoa	1970	27
	Fiche	Nord Shoa	1970	38
	Awasa	Nord Sidamo	mars 1972	45
	Lekempti	Wollega	mai 1972	50
	Holeta	Centre Shoa	décembre 1972	76
A	Keren	Erythrée	1969	23
	Asmara	Erythrée	1970	31
	Addis	Shoa	1970	33
	Lei	Sidamo	1970	37
	Koka	Shoa	février 1974	99
C	Shashemene	Sud Shoa	août 1971	40
	Debre Tsigue	Nord Shoa	décembre 1971	43
	Asella	Arussi	juillet 1972	54
	Sendafa	Nord Shoa	septembre 1972	57

+ : les N° de référence sont les mêmes que ceux utilisés dans la note précédente. On pourra se reporter à la publication précédente pour situer les lieux d'isolement sur la carte de répartition des types de virus aphteux en Ethiopie.

Nous devons reconnaître qu'il existe d'autres techniques de fixation du complément quantitatives plus précises (lecture de l'hémolyse 50 p. 100, automatisation) que celle que nous avons choisie. Nous avons retenu toutefois cette technique de semi-précision car elle correspond à nos possibilités de travail local.

2. Réalisation des titrages des sérums hyperimmuns

On réalise des titrages en échiquier, en mettant en présence chaque sérum hyperimmun dilué selon une progression géométrique de raison 1,5 avec des séries d'antigène dilué en progression géométrique de raison 2.

Le titre du sérum est l'inverse de la dilution limite du sérum fixant totalement le complément dans les conditions optimales d'association avec l'antigène.

D) Calcul de la parenté entre les souches de même type

Le titrage du sérum hyperimmun *a*, préparé à partir d'une souche *a* est réalisé d'une part vis-à-vis de l'antigène *a* (titre homologue) et d'autre part vis-à-vis d'un antigène *b* (titre hétérologue). Ces deux titres permettent d'établir le rapport :

$$r(a) = \frac{\text{Titre hétérologue du sérum anti } a \text{ contre l'antigène } b}{\text{Titre homologue du sérum anti } a \text{ contre l'antigène } a}$$

De même, le double titrage du sérum hyperimmun *b* vis-à-vis des antigènes *b* et *a* donne un titre homologue et un titre hétérologue permettant d'établir le rapport :

$$r(b) = \frac{\text{Titre hétérologue du sérum anti } b \text{ contre l'antigène } a}{\text{Titre homologue du sérum } b \text{ contre l'antigène } b}$$

Les rapports $r(a)$ et $r(b)$ représentent les relations sérologiques unilatérales entre les souches *a* et *b* : elles sont comprises entre 0 et 1. Plus ces rapports sont proches de 1, plus les souches sont semblables. Plus ces rapports sont éloignés de l'unité, plus elles sont différentes.

Ces rapports servent à préciser la parenté sérologique bilatérale *R*, exprimée en pourcentage et calculée selon la formule :

$$R = 100 \sqrt{r(a) \cdot r(b)}$$

$R = 100$ p. 100 représente l'identité sérologique bilatérale complète. Par contre, dans l'état actuel de nos connaissances, il est difficile de situer la limite à partir de laquelle la notion de variante apparaît. DAVIE (4) pense qu'on ne peut affirmer une différence certaine entre deux souches que lorsque le rapport *r* est inférieur à 0,50.

RESULTATS

Les résultats des titrages des sérums hyperimmuns anti O, A et C figurent respectivement dans les tableaux n°s II, V et VII. Sur une même ligne horizontale, on peut lire les titres d'un même sérum vis-à-vis des divers antigènes essayés. Nous avons encadré les titres homologues.

Nous n'avons présenté que les relations sérologiques unilatérales *r* des deux souches O Ghinda et O Fiche vis-à-vis des autres souches de type O (tableau n° III). En effet, nous n'avons pas pu calculer les parentés *R* pour ces deux souches.

Pour les autres souches, nous avons indiqué directement les parentés sérologiques bilatérales *R* que nous avons regroupées dans les tableaux n°s IV, VI et VIII respectivement pour les souches de type O, A et C.

TABLEAU N°II- Titres des sérums hyperimmuns de type O

Antigènes		Lausanne	Ghinda	Shola	Fiche	Awasa	Lekempti	Holeta
Sérums anti	O Lausanne	113	113	94	113	50	113	113
	O Ghinda	20	50	44	22	27	33	27
	O Shola	65	75	140	170	65	113	75
	O Fiche	15	33	44	33	22	33	27
	O Awasa	50	75	75	75	75	75	50
	O Lekempti	75	113	113	113	50	170	113
	O Holeta	113	113	113	94	65	113	113

Les titres homologues sont encadrés.

TABL. N°III-Relations sérologiques unilatérales entre les souches O Ghinda et O Fiche d'une part et les autres souches de type O.

Essai des sérums anti O	Lausanne	Shola	Awasa	Lekempti	Holeta
contre l'antigène Ghinda	1	0,54	1	0,66	1
contre l'antigène Fiche	1	1	1	0,66	0,83

TABL. N°IV - Parentés sérologiques bilatérales entre les souches de type O.

	O Lausanne	O Shola	O Awasa	O Lekempti	O Holeta
O Lausanne	100	62	54	66	100
O Shola	62	100	68	73	73
O Awasa	54	68	100	53	61
O Lekempti	66	73	53	100	81
O Holeta	100	73	61	81	100

TABLEAU N° V - Titre des sérums hyperimmuns de type A.

Antigènes		A5	A Keren	A Asmara	A Addis	A Lei	A Koka
Sérums anti	A 5	(256 ⁺)	75	75	75	33	75
	A Keren	-	256	256	170	113	170
	A Asmara	-	384	320	213	113	170
	A Addis	-	140	113	256	50	256
	A Lei	-	256	170	256	256	256
	A Koka	-	50	75	113	75	113

+ : titre indiqué par le producteur.

TABLEAU N°VI - Parentés sérologiques bilatérales entre les souches de type A.

	A Keren	A Asmara	A Lei	A Addis	A Koka
A Keren	100	100	66	60	54
A Asmara	100	100	48	54	59
A Lei	66	48	100	43	81
A Addis	60	54	43	100	100
A Koka	54	59	81	100	100

TABLEAU N°VII - Titres des sérums hyperimmuns de type C.

Antigènes		Europe	Shashemene	Debre Tsigue	Asella	Sendafa
Sérums anti	Europe	170	113	113	170	140
	Shashemene	75	170	170	170	113
	Debre Tsigue	170	256	256	256	256
	Asella	50	113	113	113	113
	Sendafa	170	256	256	256	256

TABLEAU N°VIII - Parentés sérologiques bilatérales entre les souches de type C.

	Europe	Shashemene	Debre Tsigue	Asella	Sendafa
C Europe	100	54	66	66	73
C Shashemene	54	100	100	100	81
C Debre Tsigue	66	100	100	100	100
C Asella	66	100	100	100	100
C Sendafa	73	81	100	100	100

DISCUSSION

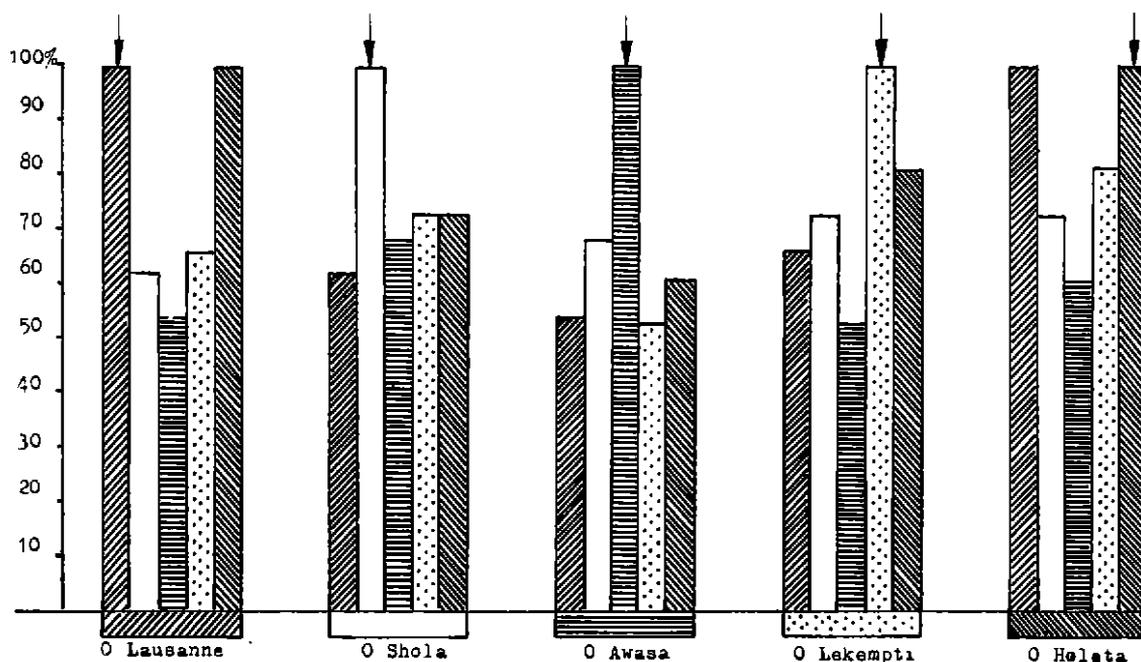
1. Souches de type O

Lorsque l'on considère les titres des sérums hyperimmuns de type O, on constate que les titres des sérums anti O Ghinda et O Fiche sont nettement insuffisants. Aussi n'avons-nous pas retenu ces deux derniers sérums pour les calculs ultérieurs.

Par contre, nous avons conservé les antigènes O Ghinda et O Fiche pour titrer les sérums hétérologues et calculer les relations unilatérales r . Ces rapports r (tableau n° III) étant au moins égaux à 0,54, on peut penser que les souches O Ghinda et O Fiche ne sont pas très éloignées des autres souches de type O.

Les parentés sérologiques bilatérales calculées pour les autres souches sont regroupées dans le tableau n° IV; les résultats concernant les souches O éthiopiennes entre elles sont encadrés. On note en effet une assez grande homogénéité entre ces souches, surtout si l'on ne tient pas compte de la souche O Awasa dont les réactifs se sont avérés médiocres.

Parmi les souches de type O, O Holéta présente les plus forts pourcentages de parenté avec l'ensemble des autres souches, tant éthiopiennes que la souche O Lausanne. De plus, il faut préciser que cette souche fut responsable d'une rupture d'immunité : elle a été isolée sur des bovins laitiers régulièrement vaccinés contre la fièvre aphteuse avec un vaccin trivalent O,



Nous avons indiqué en abscisse les sérums hyperimmuns de référence. En ordonnée se trouvent les parentés sérologiques bilatérales R exprimées en pourcentage. Chaque flèche indique la souche homologue de chaque sérum de référence : dans ce cas la parenté R atteint évidemment la valeur 100 p. 100. Ce diagramme représente les différents pourcentages R obtenus pour chaque sérum quand on essaie les différentes souches de type O.

A, C préparé au Kenya à partir de souches isolées en Afrique Orientale (la valence O est d'origine Kényanne : O K120/ 64). Ces données suggèrent que la souche O Holéta pourrait bien être une dominante parmi les souches éthiopiennes et même parmi les souches d'Afrique Orientale.

Enfin, la souche européenne O Lausanne n'apparaît pas trop éloignée de l'ensemble des souches O éthiopiennes : le pourcentage de parenté le plus faible (54 p. 100) se situe au-dessus du seuil des 50 p. 100 et il s'observe avec la souche O Awasa au sujet de laquelle nous avons déjà fait quelques réserves sur la qualité.

2. Souches de type A

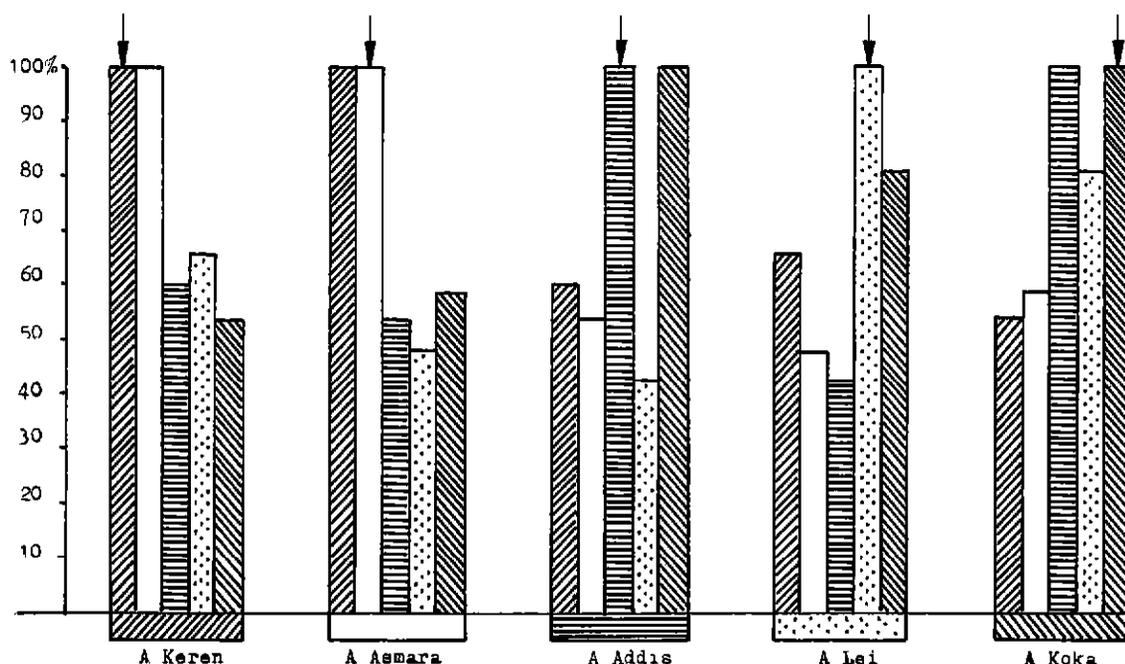
Les titres des sérums anti A sont regroupés dans le tableau n° V.

L'antigène inactivé A 5 (A Allier) dont nous disposons s'est révélé de très mauvaise qualité lorsque nous l'avons utilisé après un trop long stockage à + 4° C. Nous n'avons pas retenu les titres des sérums vis-à-vis de cet antigène.

Par contre la conservation, au congélateur, du sérum hyperimmun anti A 5, sous forme lyophilisée, ne pose aucun problème : ce sérum est utilisable avec quelques réserves toutefois. En effet, n'ayant pas pu faire le titrage homologue de ce sérum avec notre système réactionnel, puisque l'antigène A 5 était inutilisable, les titres hétérologues ne sont pas directement comparables au titre homologue annoncé par le producteur du sérum. Néanmoins, les titres hétérologues étant relativement faibles, on peut penser que la souche A 5 est assez éloignée sérologiquement des souches éthiopiennes.

Le tableau n° VI présente les résultats du calcul des parentés sérologiques bilatérales entre les souches éthiopiennes de type A. Nous avons encadré les résultats qui suggèrent une très grande parenté entre certaines souches. On met ainsi en évidence deux ensembles distincts :

1. Il y a pratiquement identité sérologique entre les deux souches érythréennes A Kéren, isolée en 1969, et A Asmara, isolée en 1970.
2. On retrouve la même identité entre deux souches isolées dans le Shoa : A Addis, isolée en 1970, et A Koka isolée en 1974. Par ailleurs,



Nous avons indiqué en abscisse les sérums de référence. En ordonné se trouvent les parentés sérologiques bilatérales R exprimées en pourcentage. Chaque flèche indique la souche homologue de chaque sérum de référence : dans ce cas le pourcentage R atteint évidemment la valeur 100 p. 100. Ce diagramme représente les différents pourcentages R obtenus pour chaque sérum quand on essaie les différentes souches de type A.

la souche A Lei, isolée dans l'extrême sud de l'Ethiopie, semble assez proche de la souche A Koka.

Il semble donc du point de vue des virus aphteux de type A, il faille distinguer en Ethiopie deux zones épidémiologiques : une zone nord avec les souches erythréennes et une zone centre-sud avec la souche A Koka comme souche de référence (*). Cela correspond d'ailleurs à deux régions d'élevage géographiquement isolées.

3. Souches de type C

Si l'on considère les titres des sérums hyper-immuns de type C (tableau n° VII), tous ces sérums se révèlent satisfaisants.

Le calcul des pourcentages *R* de parentés sérologiques bilatérales (tableau n° VIII) fait

(*) Depuis la rédaction de ce texte, l'épizootie de type A s'est largement étendue sur l'ensemble de la province du Shoa. Une nouvelle souche de ce type, isolée en novembre 1974, a retenu notre attention car elle est responsable d'une rupture d'immunité. L'étude sérologique et immunologique de cette souche est en cours. Ce fait montre le caractère provisoire de nos conclusions et la nécessité de surveiller en permanence l'évolution des souches.

apparaître la très grande homogénéité des souches éthiopiennes de type C. Ceci n'est peut-être que le reflet de l'unité épidémiologique observée sur le terrain : les foyers de type C que nous avons étudiés, tout en étant nombreux et sévères, sont assez limités géographiquement.

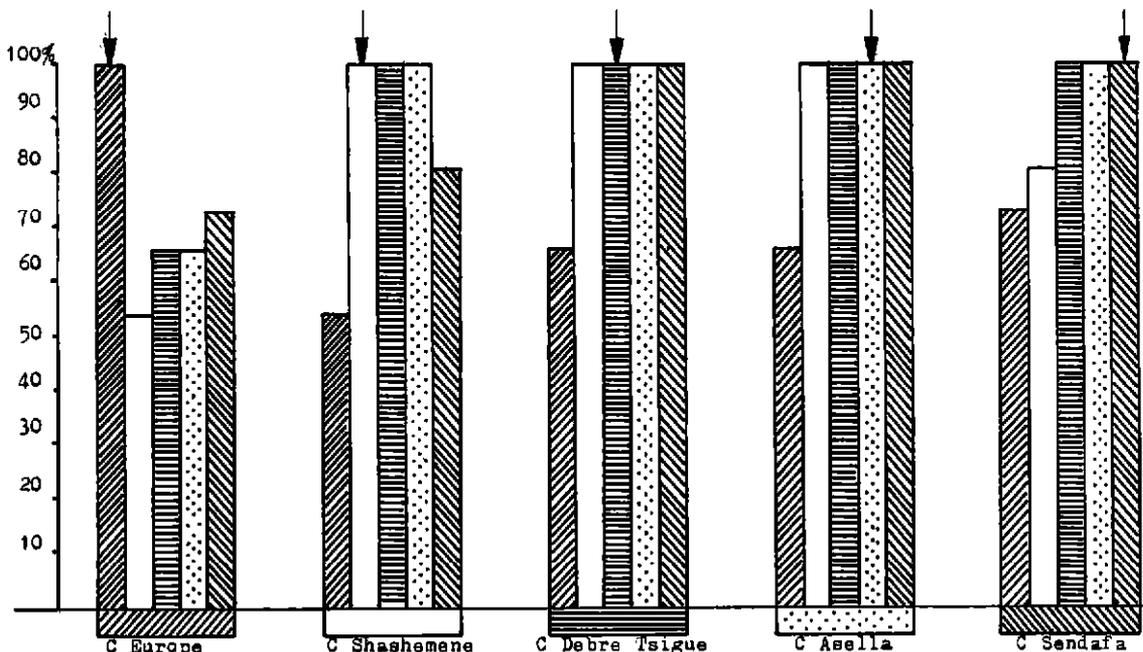
La souche C européenne diffère peu des souches de type C éthiopiennes.

CONCLUSIONS

Compte tenu des réserves avancées quant à la précision de la technique sérologique utilisée, le présent travail permet de faire un premier tri des souches de virus aphteux isolés en Ethiopie depuis 1969.

L'ensemble des souches de type O éthiopiennes contrôlées apparaît assez homogène et peu éloigné de la souche O Lausanne.

Parmi les souches de type O, la souche O Holéta semble être sérologiquement la plus complète. L'étude immunologique de cette souche mérite d'être entreprise.



Nous avons indiqué en abscisse les sérums de référence. En ordonnée se trouvent les parentés sérologiques bilatérales *R* exprimées en pourcentage. Chaque flèche indique la souche homologue de chaque sérum de référence : dans ce cas le pourcentage *R* atteint évidemment la valeur 100. Ce diagramme représente les différents pourcentages *R* obtenus pour chaque sérum quand on essaie les différentes souches de type C.

En première approximation, toutes les souches de type A éthiopiennes étudiées semblent sérologiquement distinctes de la souche A 5 européenne.

Les études immunologiques des souches A éthiopiennes devront tenir compte des deux zones épidémiologiques individualisées par la sérologie.

Enfin, les souches de type C paraissent très proches les unes des autres. Cette homogénéité reflète probablement l'unité épidémiologique observée sur le terrain.

L'intérêt d'une telle étude n'est pas simplement spéculatif. Elle constitue une étape préliminaire indispensable dans le tri des souches éthiopiennes. Il s'agit en pratique de choisir dans la collection des virus aphteux isolés en Ethiopie :

1. des souches d'épreuve pour le contrôle d'efficacité des vaccins utilisés en Ethiopie (qu'ils soient importés ou produits localement),
2. des souches vaccinales pour la production éventuelle de vaccins locaux.

Remerciements

Nous remercions le Laboratoire Roger Bellon, Usine de la Croisette (Directeur : M. GI-RAUD) à Villaines-les-Rochers par Azay-le-Rideau - France, qui nous a fait parvenir les antigènes inactivés et les sérums hyperimmuns correspondant aux souches européennes.

Nous tenons à remercier également les Docteurs Vétérinaires J.P. BERSON et X. COLSON qui ont isolé, en 1969 et 1970, les premières souches éthiopiennes étudiées ici et qui ont préparé les sérums hyperimmuns à partir de ces souches.

SUMMARY

Comparative serological study of principal strains of foot-and-mouth disease virus isolated in Ethiopia from 1969 to 1974

In a previous work, the foot-and-mouth disease virus types isolated in Ethiopia were inventoried.

The type notion being insufficient, the author investigated the possible existence of variants in each O, A and C type of available ethiopian strains.

A serological test of semi-accurate quantitative complement fixation was used and first sorted out serologically ethiopian strains.

This serological sorting constitutes a previous stage indispensable for directing further immunological studies.

RESUMEN

Estudio serológico comparativo de las principales cepas de virus aftoso aisladas en Etiopía de 1969 a 1974

En otro artículo, se hizo el inventario de los tipos de virus aftoso aislados en Etiopía.

Pero siendo insuficiente la noción de tipo, se ha tratado de poner en evidencia la existencia eventual de variantes para cada tipo O, A y C de las cepas etiopianas de que se dispone.

Se utilizó una técnica serológica de fijación del complemento cuantitativa de semiprecisión.

Habida cuenta de los límites de dicho método, se pudo efectuar una primera tria serológica de las cepas etiopianas.

Esta tria serológica constituye una etapa preliminar indispensable para orientar los estudios inmunológicos ulteriores.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERSON (J. P.), COLSON (X.), FIKRE (J.), VIGIER (M.), ASSEFA (W. G.), GUERCHE (J.), BLANC (R.), PRUNET (P.). Etude épizootologique de la fièvre aphteuse en Ethiopie (1969-1971). *Bull. off. int. Epiz.*, 1972, **77** (3-4) : 395-620.
2. BROOKSBY (J. B.). The technique of complement fixation in foot and mouth disease research. London, Her Majesty's Stationery Office, 1952. (Agricultural Research Council Report Series n° 12.)
3. CAMAND (R.). Etude sérologique des types et des variantes du virus aphteux par la réaction de fixation du complément. Thèse Doct. Méd. vét., Lyon, 1953, n° 3.
4. DAVIE (J.). The classification of subtype variants of the virus of foot and mouth disease. *Bull. off. int. Epiz.*, 1962, **57** : 962.
5. DAVIE (J.). A complement fixation technique for the quantitative measurement of antigenic differences between strains of the foot and mouth disease virus. *J. Hyg. Camb.*, 1964, **62** : 401-411.
6. JOUBERT (L.), MACKOWIAK (C.). La fièvre aphteuse. Volume I: Le virus aphteux. Paris, Expansion Scientifique Française, 1968.
7. MACKOWIAK (C.), FONTAINE (J.), ROUMIANTZEFF (M.). Types, sous-types et variantes du virus aphteux. Etude des variantes. 19th. Symp. intern., Section Permanente de Standardisation Microbiologique « Fièvre Aphteuse » variantes et immunité. Lyon, 14 juillet 1967. Volume 8, Bâle, Karger, pp. 13-64.
8. MARTEL (J. L.). La fièvre aphteuse en Ethiopie. Distribution des sérotypes de virus aphteux. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1974, **27** (2) : 169-175.
9. ROUMIANTZEFF (M.), STELLMANN (C.), DUBOUCARD (C.). Technique de fixation quantitative du complément appliquée à l'étude du virus de la fièvre aphteuse. *Bull. Soc. Sci. vét. Méd. Comp.*, Lyon, 1965, **67** : 243-269.
10. ROUMIANTZEFF (M.), DUBOUCARD (C.), FONTAINE (J.), GILBERT (H.). Méthodes sérologiques utilisées pour l'étude des variantes du virus aphteux. *Bull. Soc. Sci. vét. Méd. comp.*, Lyon, 1966, **68** : 41-54.
11. TRAUB (E.), MOLHMANN (E.). Typification de la fièvre aphteuse par la réaction de fixation du complément. *Zentralbt. Bakt. I. Orig.*, 1953, **150** : 289-310.
12. VALLEE (H.). Sur la pluralité du virus aphteux. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1928, **1** : 500.
13. VILLON (A.). Epizootologie de la fièvre aphteuse en Ethiopie. Identification des types de virus. Thèse Doct. Méd. vét., Lyon, 1973, n° 51.