

ARTICLES ORIGINAUX

Recherches en vue d'une méthode rapide de diagnostic de la peste bovine

par A. PROVOST, R. QUEVAL, C. BORREDON et Y. MAURICE

Le diagnostic clinique de la peste bovine ne souffrait, jusqu'à ces dernières années, que peu de difficulté ; ce n'est que rarement que l'on devait recourir à l'inoculation d'un veau sensible avec le matériel pathologique provenant d'un bovin suspect pour l'assurer. L'incertitude qui pesait sur les autres méthodes de diagnostic expérimental en interdisait par ailleurs l'usage.

Ce tableau, quelque peu idyllique quant à l'aisance du diagnostic, s'est modifié depuis une dizaine d'années sous l'influence de plusieurs facteurs :

— Les campagnes massives et concertées de vaccination antipestique à l'aide de vaccins d'efficacité de plus en plus parfaite, ont créé un « fond de résistance » de la population bovine africaine qui fait que la peste ne se rencontre plus guère que sur les veaux âgés de six à quatorze mois ; plus jeunes, ils bénéficient de l'immunité colostrale de leur mère, immunité acquise par une vaccination ou consécutive à une attaque antérieure du virus ; plus vieux, ils se trouvent inclus dans les campagnes annuelles de vaccination et bénéficient d'une immunité vaccinale extrêmement solide.

— La virulence du virus pestique en région d'enzootie n'est plus celle que l'on a connue autrefois. Les grandes pestes ne se rencontrent plus (si l'on veut bien excepter les deux foyers aberrants de l'Adamaoua en 1960 (1) et du Congo en 1961 (2)). Au contraire, la peste qui évolue sur les veaux du groupe d'âge que nous avons indiqué, est torpide, traînante, imprécise dans son expression clinique où se mêlent des

formes apyrétiques, non ulcératives, sans dysenterie, voire eutrophiques ou à tropisme pulmonaire.

Les virus que l'on isole alors ont un pouvoir pathogène sensiblement réduit. Si leur authenticité ne peut faire de doute, prouvée qu'elle est par séro-neutralisation en cultures cellulaires, leur inoculation au veau sensible ne fait que reproduire la peste atypique observée dans les troupeaux. Les passages en série sur veaux sensibles n'augmentent pas le pouvoir pathogène du virus, dont la grande caractéristique est de ne plus tuer. (3). Malaisé est donc le diagnostic de cette peste actuelle dont la clinique et l'épidémiologie sont déroutantes.

— Enfin s'est fait jour, tout d'abord aux U. S. A., puis en Europe et en Australie, une pathologie bovine nouvelle que l'on décrit sous l'appellation de Maladies des muqueuses, traduction littérale de l'anglais : *Mucosal diseases*. Y sont rangées deux maladies à virus : l'entérite à virus et la rhinotrachéite bovine infectieuse. La première de ces deux maladies ne se différencie, ni par sa clinique ni par son anatomie pathologique, de la peste bovine actuelle. La seconde, à tropisme plus nettement respiratoire, est d'un diagnostic différentiel plus aisé. Ces deux viroses, entérite à virus et rhinotrachéite bovine, existent en Afrique. L'entérite à virus n'a encore fait l'objet que de descriptions cliniques (4, 5, 6), dont l'une remonte à 1915, ce qui laisse à penser que ce n'est pas une maladie d'importation récente. Quant au virus de la rhinotrachéite bovine, il vient d'être identifié au Tchad (7).

Il n'est pas douteux que le diagnostic clinique différentiel de la peste telle qu'on la rencontre actuellement et de l'entérite à virus pose et posera de plus en plus un problème délicat. Or,

Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1963, 16, n° 3.
Reçu pour publication : juillet 1963.

ce problème doit être résolu, ne serait-ce que parce qu'il a son implication dans les campagnes antipestiques interterritoriales, dont la campagne de vaccination dans le bassin du lac Tchad (PJ 15 de la C. C. T. A.) a été la première à être mise en route. Ces campagnes massives de vaccination visent à l'éradication de la peste bovine.

Le corollaire de cette proposition est qu'un diagnostic exact, rapide, facile à mettre en œuvre soit mis à la portée des responsables de ces campagnes.

Certes, des progrès extrêmement sensibles ont été réalisés ces dernières années. La méthodologie de la déviation du complément a été codifiée par NAKAMURA (8), puis des techniques plus simples de BOULANGER (9) et de STONE (10) ont été publiées. La déviation du complément appliquée au diagnostic de la peste bovine (recherche de l'antigène pestique) est fidèle, très sensible, mais délicate à mettre en œuvre. Son utilisation est réservée en Afrique à quelques laboratoires rompus aux techniques de la sérologie. Sur le terrain, elle n'est d'aucune utilité.

La précipitation-diffusion en gélose est d'un emploi beaucoup plus commode. SCOTT et BROWN (11) ont décrit en détail la technique telle qu'elle peut être appliquée sur le terrain et SCOTT (12) a tout récemment apporté quelques précisions supplémentaires. Ne demandant qu'un minimum de technicité et un appareillage réduit, cette réaction a connu un grand succès et a été largement vulgarisée*.

Elle souffre toutefois de désavantages mineurs, tels la nécessité de faire des trous dans la plaque de gélose à l'aide d'un instrument d'achat relativement onéreux, l'impératif de transporter les réactifs sous froid, l'obligation dans les régions équatoriales à température moyenne supérieure à 30° C de placer les boîtes dans des bacs entourés de glace pour éviter la thermo-inactivation de l'antigène, avec comme corollaire le bris possible de la boîte de Petri ou l'échappée des réactifs hors de leurs réservoirs sous l'influence de chaos.

* Deux cours sur le diagnostic de la peste bovine ont été organisés par la F. A. M. A., au bénéfice de vétérinaires travaillant en brousse. La pratique de la précipitation en gélose leur a été enseignée.

Ces considérations nous ont amenés à modifier la technique et à en étudier d'autres qui, par la simplicité de leur méthodologie, pourraient être utiles sur le terrain, « au chevet » du bovin suspect de peste bovine. Ce sont les résultats de nos recherches que nous exposons dans cette note.

I. — LA PRÉCIPITATION EN GÉLOSE PAR LA MÉTHODE DES DISQUES

Le principe de la réaction est toujours le même : migration de l'antigène et de son anticorps spécifique dans un gel d'agar, et formation, le cas échéant, de l'immun-complexe antigène-anticorps qui se matérialise dans le gel par une ligne blanchâtre de précipitation. Les modifications que nous avons introduites portent :

- sur la composition du gel ;
- sur le format et la matière des boîtes de Petri.

L'idée nous en a été donnée par un travail d'ELEK (15) qui imprégnait d'antisérum une bande de papier filtre sur laquelle il coulait une gélose nutritive ; après avoirensemencé un microbe toxigène en strie au-dessus de la bande de papier filtre, apparaissaient des lignes de précipitation entre toxine et anticorps qui avaient diffusé dans la gélose.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1° Sérum précipitant.

Deux sortes de sérums ont été essayées :

a) Le sérum préparé conventionnellement sur lapin à l'aide du virus pestique lapinisé, en suivant le protocole II de SCOTT et BROWN (11). Les lapins sont saignés à blanc par ponction cardiaque le 25^e jour après le début de l'immunisation ; le sérum de chaque lapin est titré selon la technique exposée par SCOTT (13). Les sérums de titre égal ou supérieur à 1/10 sont mélangés ; le mélange de sérum est réparti en ampoules par quantités de 2 ml et conservé à — 20° C.

b) Douze poules reçoivent par voie intramusculaire sept injections de 5 ml chacune, espacées d'une semaine, d'une suspension au demi en sérum physiologique de rates de chè-

vres réagissantes à l'inoculation de virus capripéste. Elles sont saignées par ponction cardiaque une semaine après la dernière injection. Le sérum est utilisé immédiatement pour imprégner les disques.

2° Antigènes.

Les antigènes positifs et négatifs de référence sont préparés selon la technique de SCOTT et BROWN (11) : broyage au 1/3 en sérum physiologique de ganglions lymphatiques dégraissés et décapsulés provenant d'un veau réagissant à l'inoculation d'une souche virulente de virus bovipéste (pour l'antigène positif) ou de veaux de France (pour l'antigène négatif) ; tamisage sur gaze ; répartition en flacons ; conservation à -20°C ; une partie aliquote est titrée en présence d'un sérum précipitant connu ; seuls, les antigènes positifs de titre supérieur à 1/10 sont conservés ; les antigènes négatifs ne doivent pas précipiter.

L'antigène suspect provient d'un bovin suspect d'être atteint de peste bovine. Il est obtenu soit à l'autopsie du cadavre en suivant la technique de SCOTT et BROWN (11), soit par biopsie ganglionnaire sur l'animal vivant (14). Nous redécrivons la technique pour le besoin des lecteurs :

— Antigène préparé à partir du cadavre : prélever un ganglion mésentérique, ou un préscapulaire si la décomposition est avancée. Le conserver sous froid si on ne le traite pas immédiatement. Dégraisser et enlever la capsule. Couper en petits morceaux de 1 mm de côté. Broyer au mortier et au pilon ; ajouter un peu de sable si besoin est. Récolter les quelques millilitres de lymphé ganglionnaire. S'il n'y en a pas, continuer le broyage en ajoutant 1 ml de sérum physiologique. Lymphé ou sérum dans lequel a macéré le broyat constituent l'antigène suspect.

— Antigène obtenu par biopsie. Monter une aiguille 3-12/10 sur une seringue de 5 ou 10 ml. Couper les poils à l'endroit où l'on perçoit sous la peau un ganglion préscapulaire. Désinfecter l'endroit. Mobiliser le ganglion à la main. Enfoncer l'aiguille dans la masse ganglionnaire, en prenant garde qu'elle ne glisse pas sur le ganglion. Aspirer très lentement la lymphé ganglionnaire. On en peut ainsi collecter 1 ml.

Cette lymphé est l'antigène suspect, que l'on utilise immédiatement ou qui est placée dans un tube à hémolyse bouché hermétiquement et conservé sous froid jusqu'à ce que l'on s'en serve.

3° Gel de gélose.

On prépare une gélose molle selon la formule suivante :

— Difco Noble Agar *	2 g
— Thimerosal **	0,16 g
— Eau distillée	400 ml

Le mélange est maintenu 1/2 heure au bain-marie bouillant pour assurer la dissolution complète de la gélose, puis réparti en quantités de 2 ml dans des tubes à hémolyse en pyrex, qui sont immédiatement bouchés au bouchon de caoutchouc. Ces tubes sont conservés à température ordinaire : le merthiolate contenu dans le milieu prévient toute culture microbienne dans le gel.

A la demande, on fait fondre au bain-marie bouillant des tubes contenant la gélose qui est coulée dans des boîtes de plastique à raison d'un tube par boîte.

4° Boîtes.

Notre choix s'est porté sur des boîtes rondes de 5 cm de diamètre, fermant hermétiquement, réalisées en matière plastique transparente et incassable*.

Deux ml de gélose à 0,5 p. 100 y sont coulés à la demande, réalisant ainsi une plaque de gélose molle d'environ 1 mm d'épaisseur. Le gel, bien que mou, a tout de même une consistance suffisante pour que la boîte puisse être placée en n'importe quelle position sans qu'il se déforme.

* Difco Noble Agar : O. S. I., 141, rue de Javel à Paris (15^e).

** Dénomination française du Merthiolate de E. Lilly and Co. : Serlabo, 26, rue Saint-Gilles, Paris (3^e).

* Référence PD 10 04700, vendues par Millipore Filter Corp. Bedford, Mass. U. S. A. Cette firme est représentée en France par les Et. Jouan, 113, bd St-Germain, Paris (6^e). A défaut, on peut utiliser les boîtes plastique Falcon (réf. 1.018) fabriquées par Gateway International, 400 S. Alvarado Street, Los Angeles 57, Calif. U. S. A. et vendues en France par Bedson et Dickinson Inc. Grenoble, Isère. Ces boîtes ont le désavantage de ne pas fermer hermétiquement et nécessitent donc une bande adhésive genre albu-plast pour fixer le couvercle.

5° Disques.

Des disques pour antibiogrammes de 1 cm de diamètre et d'environ 0,5 mm d'épaisseur sont imprégnés au laboratoire des différents réactifs : sérum, antigènes positifs et négatifs. Pour cela, on dispose une cinquantaine de disques dans le fond d'une boîte de Petri ordinaire, puis on les recouvre soit de sérum, soit de l'un ou de l'autre des antigènes. Pour la commodité des utilisateurs, les disques ont été choisis de couleurs différentes et marqués d'une lettre d'imprimerie caractéristique :

- disque blanc, marqué S : sérum précipitant ;
- disque rouge, marqué P : antigène positif de référence ;
- disque bleu, marqué N : antigène négatif de référence.

Les disques en papier buvard de couleur verte, non marqués, seront imprégnés de l'antigène suspect au moment de la réalisation de la réaction.

Des disques imprégnés S, P et N sont disposés sur un grillage moustiquaire et portés dans un lyophilisateur Stokes.

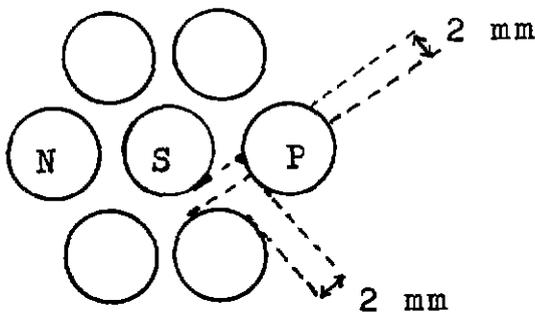


Fig. 1. — Disposition des disques sur la gélose.

- Disque blanc S : sérum précipitant.
- Disque rouge P : antigène positif de référence.
- Disque bleu N : antigène négatif de référence.
- Disques verts non marqués : antigène suspect.

Lorsqu'ils sont desséchés, ils sont placés par catégorie dans des tubes à hémolyse contenant quelques grains de silicagel jouant le rôle d'absorbant. Les tubes sont bouchés au bouchon de caoutchouc et conservés à température ordinaire.

6° Réalisation du test.

L'opérateur dispose :

- de tubes contenant 2 ml de gélose, qu'il fait fondre au bain-marie bouillant ;
- de boîtes en matière plastique, dans lesquelles il coule la gélose fondue ;
- de disques imprégnés de sérum précipitant et des antigènes positifs et négatifs, disques qui peuvent être conservés à température ordinaire ;
- de disques de couleur verte, qu'il imprègne lui-même avec l'antigène suspect préparé ainsi que nous l'avons décrit plus haut.

Lorsque la gélose est figée, il dépose à l'aide de pinces anatomiques selon le schéma de la figure 1 : au centre de la boîte, le disque S ; de chaque côté de ce disque, et sur un même diamètre, un disque P et un disque N de telle sorte que chacun de ces disques soit à 2 mm de la circonférence du disque S.

Les disques verts imprégnés d'antigène suspect sont disposés en couronne autour du disque S, à 2 mm de sa circonférence.

La réhydratation des disques secs se fait dans les secondes qui suivent leur dépôt sur la gélose molle.

La boîte est refermée et placée :

- soit à température ordinaire si celle-ci n'excède pas 25° C ;
- soit dans un réfrigérateur à + 4° C, soit dans la glace, soit dans des linges humidifiés placés au soleil (permettant d'obtenir en leur centre une température de 20° C), si la température ambiante est supérieure à 25° C.

Les lectures se font à 12, 24, 36 et 48 heures. Pour ce faire, on examine les boîtes dans une pièce obscure en les tenant à quelques centimètres au-dessus d'un fond noir et on fait arriver par en dessous, avec une incidence d'environ 45°, un faisceau lumineux (lampe de poche, par exemple) (fig. 2).

RÉSULTATS

Apparition des lignes de précipitation.

- a) *Sérum précipitant de lapin*. En 12 heures, à la température ordinaire (20-25° C), en 24 à

36 heures, à la température de 0-4° C, apparaît entre les disques S et P une ligne blanchâtre de précipitation (fig. 2). Si l'antigène suspect provient d'un bovin pestique, apparaissent également entre le disque S et les disques verts une ligne de précipitation qui va se fondre avec la première. Il n'y a jamais de ligne entre les disques S et N.

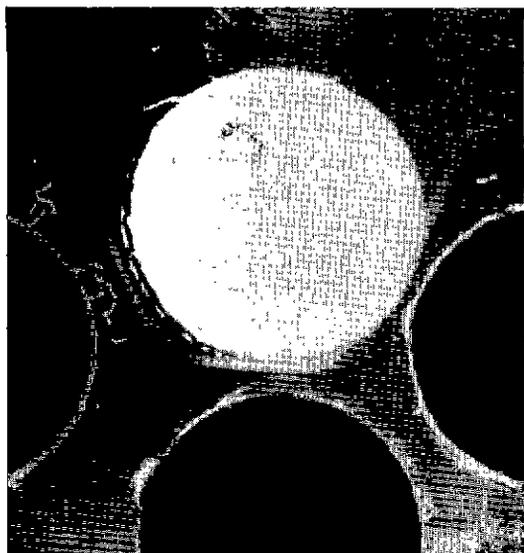


Fig. 2. — Lignes de précipitation en gélose. Photographie non retouchée grossissement 4. Au centre, disque S imprégné d'antisérum précipitant ; à droite et à gauche, disques P imprégnés d'antigène positif ; en bas, disque imprégné d'antigène suspect (positif). Noter que les lignes de précipitation se fondent les unes dans les autres.

b) *Sérum de poule*. Nos essais n'ont pas été concluants dans le sens où nous le désirions. S'il apparaît bien une ligne de précipitation qui va se fondre avec la ligne existant entre les disques P et S de sérum de lapin, témoignant ainsi de la présence d'un anticorps précipitant spécifique dans le sérum de nos poules, de nombreuses autres lignes apparaissent également, qui peuvent troubler un observateur non averti.

Pour cette raison, nous n'avons pas continué l'étude de ces sérums et les disques que nous présentons ne sont imprégnés que de sérum de lapin.

Sensibilité.

La réaction ainsi décrite est plus sensible que le test conventionnel de SCOTT et BROWN,

si l'on se base pour l'apprécier sur la vitesse d'apparition des lignes.

Alors que la précipitation en gélose demande 18 heures pour qu'apparaisse une ligne entre les réservoirs contenant l'antisérum et l'antigène positif et souvent plus de 24 heures pour que se manifeste une ligne de précipitation entre les réservoirs d'antisérum et d'antigène suspect, la méthode des disques donne ses lignes en 12 à 16 heures. Ce gain de temps tient à ce que les disques disposés sur la gélose sont plus rapprochés les uns des autres (2 mm) que les réservoirs creusés dans la gélose (4 à 10 mm). La diffusion des réactifs est plus rapide.

DISCUSSION

La méthode de précipitation en gélose que nous présentons a plusieurs avantages pour une utilisation sur le terrain par rapport à la méthode classique :

- les disques imprégnés de réactifs lyophilisés sont aisément transportables sans prendre aucune précaution. La stabilité des réactifs est bonne ;

- la gélose préparée à l'avance, se conserve à température ordinaire sans se dessécher dans des tubes bouchés ;

- il est plus aisé de disposer des disques sur la gélose que de forer des cupules et de les remplir, ce qui nécessite un instrument spécial et des pipettes Pasteur qui peuvent se casser dans les transports ;

- les boîtes contenant gélose et disques lorsque la réaction a été effectuée se transportent sans précaution spéciale hormis l'impératif thermique pour lequel nous avons donné des solutions ;

- gélose en tubes, disques imprégnés, peuvent être préparés par un laboratoire central, ce qui garantit la reproductibilité des résultats.

Nous n'avons pas spécialement étudié la spécificité de la réaction. Il n'y avait pas lieu de le faire puisque les antigènes ont été préparés de la manière conventionnelle, que les disques sont des supports inertes sur le plan antigénique et que la spécificité a été attestée par les études de SCOTT et BROWN (11).

Pour toutes ces raisons, il nous semble que la réaction de précipitation-diffusion telle que

nous l'avons décrite mérite une large diffusion pour pouvoir être employée sur le terrain dans le diagnostic des formes atypiques de peste bovine.

II. — UNE RÉACTION D'HÉMAGGLUTINATION CONDITIONNÉE

La réaction de précipitation en gélose, même simplifiée, a un inconvénient : c'est une certaine latence, variable de 12 à 24 heures, entre le moment où est effectuée la réaction et celui de sa lecture. Une réaction sérologique, qui pourrait être lue immédiatement, aurait donc de nombreux avantages. Si une telle réaction existait, et si elle était réellement sensible et spécifique, on aurait un test qui permettrait à un inspecteur d'abattoir, par exemple, de savoir si une carcasse héberge ou non le virus bovipestique. C'est ce mobile qui nous a incité à entreprendre les recherches que nous exposons maintenant.

L'idée nous a été donnée par la lecture d'une communication de SEGRE (16) qui a étudié une réaction d'hémagglutination rapide pour la peste porcine. Le principe de la réaction est toujours celui d'une union de l'antigène (le virus bovipestique) avec son anticorps spécifique ; mais dans ce cas particulier, l'anticorps est « figuré » car couplé à des hématies ; la réaction positive devient ainsi macroscopiquement visible : c'est une hémagglutination du complexe anticorps-hématies et de l'antigène viral.

Dans un premier temps, il faut donc coupler anticorps et hématies, puis ensuite étudier la réaction d'hémagglutination par elle-même.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1° Choix et traitement des hématies.

Notre choix s'est porté sur les hématies de chèvres, dont FINE, EYQUEM et MAILLOUX (17) ont démontré l'inagglutinabilité par les sérums de bovins. Cette qualité était *a priori* précieuse car elle permettait l'examen de lymphes bovines sans recourir à une absorption préalable par des hématies caprines.

Plusieurs chèvres sont saignées, les hématies étant récoltées et conservées à $+ 4^{\circ}$ C en solution d'Alsever. Elles sont ensuite hyperformolées selon les indications de FAUCONNIER (18) ; les hématies formolées sont conservées à 4° C en suspension à 50 p. 100 en sérum physiologique.

2° Sérums hyperimmuns et γ -globulines.

a) *Sérum de bœuf*. Un bœuf, immun de peste bovine, est inoculé par voie sous-cutanée, chaque semaine pendant 6 semaines consécutives, avec 100 ml d'un broyat au 1/3 en sérum physiologique de ganglions pestiques. La saignée est effectuée une semaine après la dernière inoculation. Le sérum est conservé à $- 20^{\circ}$ C.

b) *Sérum et γ -globulines de lapin*. Le sérum antipestique de lapin est obtenu par la méthode II de SCOTT et BROWN (11). On en extrait les γ -globulines par la technique de DUBERT et coll. (19). Elles sont remises en solution à 50 p. 100 en sérum physiologique, utilisées immédiatement ou conservées le minimum de temps à $+ 4^{\circ}$ C.

3° Couplage du sérum ou des γ -globuline aux hématies formolées.

On emploie la benzidine tétrazotée qui par ses liaisons N= sert de pont entre les hématies et l'anticorps.

a) *Préparation de la benzidine tétrazotée (BTA)*. A partir de la benzidine pure R. P. et du nitrite de sodium pour analyses R. P., on suit la technique exposée par KABAT et MAYER (20). Dans nos conditions expérimentales, la réaction demande environ 30 minutes pour être complète. La BTA est conservée par quantités de 10 ml à $- 20^{\circ}$ C.

b) *Couplage*. Il est réalisé en suivant point par point la technique de SEGRE (16). Les hématies couplées au sérum ou à la γ -globuline sont remises en suspension aux concentrations de 1 et 20 p. 100 en sérum physiologique ; la couleur de la suspension est rouge orangée.

Quelques lots d'hématies formolées, couplées ont été lyophilisés, traitement permis par le formolage préalable qui tanne les hématies et les rend insensibles aux chocs osmotiques. Les hématies sont ensuite remises en suspension à la concentration désirée.

4° Antigène pestique.

On broie au broyeur Turmix avec un minimum de sérum physiologique les ganglions provenant d'un veau réagissant à l'inoculation d'une souche virulente de virus bovine pestique. Le broyat est légèrement centrifugé ; le surnageant est considéré comme l'antigène positif pur. Dans quelques essais, on s'est servi de ganglions de chèvres réagissantes à l'inoculation de virus capripistique, qui ont été traités de la même manière. Avec des ganglions de bœufs sains abattus à l'abattoir de Fort-Lamy on réalise en suivant le même protocole un antigène négatif.

Dans d'autres essais (hémagglutination sur lame) on se contente d'exprimer quelques gouttes de lymphes ganglionnaires de veau ou de chèvre, que l'on traite aussitôt. On obtient ainsi un antigène positif et un antigène négatif selon que l'on fait appel à des ganglions infectés ou non.

5° Réaction d'hémagglutination.

a) *Réaction lente en tubes.* On réalise des dilutions en sérum physiologique de l'antigène pestique de 1/10 à 1/2.560.

Un demi ml de chaque dilution est réparti dans une série de tubes auxquels on ajoute 1 goutte (0,05 ml) de la suspension d'hématies à 1 p. 100. On agite et porte pendant 2 heures au bain-marie à 37° ; on fait la lecture à l'aide d'un miroir concave. On apprécie la présence d'une hémagglutination ; elle se traduit par un dépôt irrégulier des hématies dans le fond des tubes ; l'absence d'hémagglutination est caractérisée par une pastille d'hématies très nette, à bords non frangés. On note la dilution donnant une hémagglutination nette.

L'antigène négatif est traité de façon similaire.

b) *Réaction sur lame.* A une goutte de l'antigène, on ajoute une goutte de la suspension d'hématies à 20 p. 100. On mélange soigneusement et on agite la lame en la basculant. La lecture se fait dans les deux minutes et on apprécie l'absence ou l'intensité de l'agglutination sur une échelle arbitraire de + à + + + +.

RÉSULTATS

1° Hématies couplées au sérum de bœuf.

a) *Réactions en tubes.* Les hémagglutinations sont présentes aux mêmes titres (1/80 — 1/160)

dans les deux séries de dilutions de l'antigène positif et l'antigène négatif.

b) *Réaction sur lame.* Des agglutinats apparaissent avec l'antigène positif et l'antigène négatif, avec peut-être un léger retard pour ce dernier.

La sanction pratique était de rejeter les hématies couplées au sérum de bœuf. Il est vraisemblable que les réactions non spécifiques tiennent à des anticorps produits chez le bœuf donneur de sérum par les inoculations répétées de broyat ganglionnaire.

2° Hématies couplées aux γ -globulines des lapins.

a) *Réaction en tubes avec les antigènes positifs.* On note des hémagglutinations allant du 1/80 au 1/640 pour les ganglions de veau, pouvant atteindre 1/2.560 pour les ganglions de chèvres. Malheureusement, les témoins antigènes négatifs présentent eux aussi des hémagglutinations, de faible titre il est vrai (1/10 à 1/40).

b) *Réaction sur lame.* Les ganglions de veau infectés de peste fournissent tous de très belles hémagglutinations. Mais, là encore, on retrouve des hémagglutinations, moins denses et d'apparition moins rapide, avec les ganglions normaux.

Sur 125 ganglions de chèvres infectées, 85 (soit 68 p. 100) donnent des hémagglutinations d'intensité + + + et + + + +. Mais 11 p. 100 des chèvres non infectées en fournissent également.

DISCUSSION

Il est évident que d'après nos résultats, l'hémagglutination conditionnée en tube ou sur lame telle que nous l'avons employée, ne peut être utilisée pour un diagnostic de certitude de la peste bovine. Il semble bien qu'existe une authentique réaction antigène-anticorps entre le virus pestique et la globuline, ainsi que le démontrent les titres élevés d'hémagglutination obtenus, mais les hémagglutinations observées avec les antigènes négatifs demandent une explication.

Nous avons pu démontrer (23) que 2,2 p. 100 des sérums de zébus avaient des hétéro-hémagglutinines naturelles pour les hématies de chèvres, apportant ainsi une contribution au travail de FINE et Coll. (17).

C'est néanmoins avec une fréquence beaucoup plus grande (70 p. 100 pour la réaction en tube, 90 p. 100 pour la réaction sur lame) que nous retrouvons ces hétéro-hémagglutinines. L'explication (23) se trouve dans le fait que les animaux fournissant l'antigène négatif dont nous nous sommes servis, avaient récemment été vaccinés contre la péripneumonie, vaccination qui induit dans l'organisme du bœuf des anticorps à activité sérologique Forssman ; or l'antigène Forssman est présent dans les hématies de chèvres.

Pour que la réaction soit spécifique, il faudrait donc épuiser les lymphes ganglionnaires suspects avec des hématies de chèvres afin d'éliminer les anticorps hétérophiles. C'est une solution que nous n'avons pas voulu explorer, car elle introduit une complication dans une technique que nous désirions *a priori* simple pour pouvoir en faire une méthode de dépistage de la peste sur le terrain ou à l'abattoir.

Il n'en reste pas moins que le principe de la réaction d'hémagglutination conditionnée est valable. L'absorption des antigènes suspects (lymphe ganglionnaire) ou la recherche d'hématies d'autres espèces ne possédant ni antigène Forssman ni antigène hétérophile (hématies de reptiles, de batraciens ?) est à explorer.

III. — RÉACTIONS D'AGGLUTINATION CONDITIONNÉE

Nous venons d'exposer que l'une des causes des erreurs introduites dans la réaction d'hémagglutination conditionnée était l'utilisation des hématies de chèvres en temps que support figuré de l'anticorps. Nous avons pensé pouvoir substituer aux hématies un support antigéniquement inerte, tel le tannate de bismuth ou le sulfate de baryum, suivant en cela les expériences préliminaires de PICK et NELKEN (21) et de GILBOA-GARBER et NELKEN (22).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1^o Suspensions — support.

a) *Tannate de bismuth.* On utilise le tannate de bismuth du commerce (*), produit impur

* B. D. H. Ltd, Poole, Angleterre, représenté en France par SERLABO, 26, rue Saint-Gilles, Paris (3^e).

contenant de gros cristaux d'oxyde de bismuth. On le purifie selon la technique de PICK et NELKEN (21) et on prépare une suspension de particules relativement homogènes à 3 p. 100 en sérum physiologique.

b) *Sulfate de baryum.* On se sert du sulfate de baryum R. P. Ce sulfate contient des particules de tailles différentes. Les plus grosses sont éliminées par sédimentation rapide (30 secondes) d'une suspension de sulfate de baryum en sérum physiologique et décantation du surnageant ; en répétant plusieurs fois l'opération, on obtient une suspension à grains homogènes. On la standardise à 3 p. 100 de sulfate de baryum en sérum physiologique.

2^o *γ-globulines de lapin.* Elles sont obtenues ainsi qu'il a été indiqué précédemment.

3^o *Couplage.* Cette opération se réalise très simplement en mélangeant à parties égales la suspension de tannate de bismuth ou de sulfate de baryum avec la solution de γ-globulines. Après séjour de 20 minutes à 25^o C, on centrifuge et on lave 3 fois le sédiment en sérum physiologique pour éliminer la γ-globuline. On remet en suspension à 3 p. 100 en sérum physiologique et on conserve à + 4^o C. Il faut agiter vigoureusement avant l'emploi. Quelques essais ont été réalisés avec une suspension de sulfate de baryum à 20 p. 100.

4^o *Antigènes.* Réalisés ainsi qu'il a été dit plus haut.

Dans quelques essais, on utilise comme antigène positif, le milieu de cultures cellulaires infectées de virus bovipestique, récolté lors de l'effet cytopathique maximum du virus ; l'antigène négatif est constitué par le milieu de cultures identiques non infectées.

5^o *Réactions.* On procède à des dilutions des antigènes positifs et négatifs du 1/2 au 1/2.048, en sérum de cheval au 1/10. On répartit 0,4 ml de chaque dilution dans une série de tubes et on ajoute 1 goutte (0,05 ml) de suspension de tannate de bismuth ou de sulfate de baryum couplé à la γ-globuline. On agite vigoureusement.

Les tubes contenant le tannate de bismuth sont laissés 2 heures au réfrigérateur, puis agités de nouveau.

On lit l'agglutination à l'aide d'un miroir con-

cave au bout de 4 heures de repos. Une nouvelle agitation suivie d'une autre lecture le lendemain peut être faite.

La sédimentation des particules de sulfate de baryum est très rapide. On fait une première lecture au bout de 10 minutes, on agite de nouveau et on fait une autre lecture 1/2 heure après, en utilisant toujours le miroir concave pour examiner le fond des tubes.

Des essais d'agglutination sur lame ont été réalisés avec la suspension de sulfate de baryum à 20 p. 100 : mélange d'une goutte de lymph ganglionnaire et d'une goutte de suspension — agitation — lecture au bout de deux minutes.

RÉSULTATS

1^o Avec le tannate de bismuth. Nous n'avons obtenu aucune agglutination ; la pastille qui se forme dans les deux séries de tubes contenant l'antigène positif ou négatif est la même.

2^o Avec le sulfate de baryum. Des résultats très nets sont enregistrés. Les ganglions infectés donnent des agglutinations de titre allant de 1/256 à 1/2.048 (atteignant même 1/8.192 avec les liquides de cultures cellulaires) alors que les antigènes négatifs donnent des pastilles dans le fond des tubes (absence d'agglutination).

Il ne semble pas qu'il y ait beaucoup d'intérêt à faire une seconde lecture ; la première faite après 10 minutes est suffisante.

Les agglutinations qui se forment sont fines ; on note un dépôt pulvérulent sur tout le fond du tube. Cet aspect est très net pour un œil averti et exercé ; mais nous pensons qu'il faut néanmoins une certaine habitude des réactions sérologiques pour pouvoir l'apprécier. En tout état de cause, il faut toujours faire la lecture par comparaison avec des témoins négatifs.

La réaction sur lame donne des résultats discordants par suite de la présence d'agglomérats de fibrine dans la lymph brute exprimée des ganglions.

DISCUSSION

La réaction au tannate de bismuth n'a pas connu de succès entre nos mains. Il est vraisemblable que les γ -globulines ne se sont pas adsorbées sur les particules.

Par contre, la réaction au sulfate de baryum

semble intéressante. Elle se montre spécifique et sensible, mais délicate dans son interprétation. A notre sens, c'est une méthode qui doit être réservée au laboratoire pourvu d'un personnel entraîné. Nous ne saurions la recommander comme une technique applicable sur le terrain. Elle nous paraît néanmoins digne d'être étudiée sur une plus grande échelle ; c'est un des buts de cette note de la proposer.

IV. — CONCLUSION

Nous nous étions donnés comme fil conducteur de ces recherches, d'élaborer une technique simple, rapide, sensible et fidèle de diagnostic expérimental de la peste bovine. L'impératif en était fourni par la nouvelle expression anatomoclinique de la peste et par l'apparition de maladies bovines pouvant la simuler dans de nombreux caractères.

Le résultat de nos recherches se concrétise en deux propositions :

1^o Vulgarisation d'une technique simplifiée de précipitation-diffusion en gélose, dans laquelle les réservoirs contenant les réactifs et ces réactifs eux-mêmes sont remplacés par des disques de papier-buvard imprégnés d'antisérum et des antigènes, puis desséchés. Ces disques, présentés avec un code coloré, sont thermostables et aisément transportables.

La préparation des réactifs peut ainsi se faire dans un seul laboratoire, ce qui assure une standardisation des résultats. La technique proposée semble être particulièrement adaptée pour une utilisation sur le terrain.

2^o Etude au laboratoire de la réaction d'agglutination des particules de sulfate de baryum ayant adsorbé une γ -globuline antipestique. Quoique simple à réaliser, cette réaction reste délicate de lecture et d'interprétation. Elle ne peut être à notre sens qu'un adjuvant aux méthodes expérimentales du diagnostic de la peste bovine. Sa valeur réelle reste à prouver par l'examen d'un grand nombre d'échantillons.

Telles que nous les présentons, nous espérons que les deux réactions proposées seront appelées à rendre des services.

*Laboratoire de recherches vétérinaires
de Farcha- Fort-Lamy (Rép. du Tchad)
Service de Virologie.*

SUMMARY

Research on rapid diagnostic methods for rinderpest virus

Emphasis has been placed on the necessity for a diagnostic test for the presence of rinderpest virus, which is simple, rapid, sensitive, and specific in order to determine the part played by the bovine rinderpest virus in the rinderpest-like infections which are encountered in Africa nowadays.

The author suggests (a) for field diagnostic purposes, a simplified modification of the agar precipitin test by using filter paper discs impregnated with the different constituents for the test and dried. (b) for laboratory purposes, a test using particles of barium sulphate combined with anti-rinderpest gamma-globulin.

The details of these techniques are described.

RESUMEN

Investigaciones con vista a un método rápido de diagnóstico de la peste bovina

Después de insistir sobre la necesidad de un método de diagnóstico experimental de la peste bovina, que sea a la vez simple, rápido, sensible y fiel, a fin de poder apreciar la parte que corresponde al virus bovipéptico en las enfermedades bovinas «pestiformes» que en nuestros días se suelen encontrar en Africa, los autores proponen :

— para su empleo en el campo, un método simplificado de precipitación en gelosa, utilizando discos de papel secante impregnados de diferentes reactivos desecados ;

— para su empleo en el laboratorio, una reacción que utiliza las partículas de sulfato de bario asociadas a una gamma-globulina antipestica.

BIBLIOGRAPHIE

1. BLANC (R.). — **Epizootie de peste bovine en Adamaoua.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1961, **14**, 385-92.
2. DORMAL (R.), HERIN (V.) et BUGYAKI (L.). — **Relation concernant le foyer de peste bovine identifié dans les élevages du Nord de la province de l'Equateur de la République du Congo.** *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1961, **9**, 127-34.
3. PLOWRIGHT (W.). — **Some properties of strains of rinderpest virus recently isolated in E. Africa.** *Res. Vet. Sc.*, 1963, **4**, 96.
4. MONTGOMERY (R. E.). — *Rep. Dep. Agr. Brit. East Afr.*, 1914-5, p. 142.
cité par : BROWN (R.) et SCOTT (G. R.). — **Mucosal Disease complex.** *Vet. Rec.*, 1957, **69**, 916.
5. OTTE (E.) et PECK (E. F.). — **A note on a rinderpest — like disease of cattle in Ethiopia.** *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1960, **8**, 203-16.
6. OTTE (E.). — **A note on a rinderpest — like disease in the Sudan and Ethiopia.** *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1961, **9**, 215-26.
7. PROVOST (A.) et BORREDON (C.). — **Isolement et identification du virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse au Tchad.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* (à paraître).
8. NAKAMURA (J.). — **La réaction de fixation du complément en matière de peste bovine.** Brochure éditée par l'O. I. E., 1959, 93.
9. BOULANGER (P.). — **Application of the complement — fixation test to the demonstration of rinderpest virus in the tissue of infected cattle, using rabbit antiserum.** *Canad. J. Comp. Med.*, 1957, **21**, 379-88.
10. STONE (S. S.) et MOULTON (W. M.). — **A rapid serologic test for rinderpest.** *Am. J. vet. Res.*, 1961, **22**, 18-22.
11. SCOTT (G. R.) et BROWN (R.). — **Rinderpest diagnosis with special reference to the agar gel double diffusion test.** *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1961, **9**, 83-125.
12. SCOTT (G. R.). — **Optimal incubation temperature for the rinderpest agar gel double diffusion test.** *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1962, **10**, 457-60.

13. SCOTT (G. R.). — Bovine hyperimmune serum in the diagnosis of rinderpest. *Vet. Rec.*, 1962, **74**, 409.
14. BROWN (R. D.) et SCOTT (G. R.). — Diagnosis of rinderpest by lymph node biopsy. *Vet. Rec.*, 1960, **72**, 1.055-6.
15. ELEK (S. D.). — The serological analysis of mixed flocculating systems by means of diffusion gradients. *British J. exp. Path.*, 1949, **30**, 484.
16. SEGRE (D.). — Detection of hog cholera virus by a hemagglutination test. *Am. J. vet. Res.*, 1962, **23**, 748-50.
17. FINE (J.), EYQUEM (A.) et MAILLOUX (M.). — Les hétéro-hémagglutinines dans le règne animal. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 74.
18. FAUCONNIER (B.). — Utilisation des hémagglutinines hyperformolées en virologie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 777-80.
19. DUBERT (J. M.), SLIZEWICZ (P.), REBEYROTTE (P.) et MACHEBŒUF (M.). — Nouvelle méthode de séparation des protéines sériques par le méthanol. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 370-4.
20. KABAT (E. A.) et MAYER (M. M.). — *Experimental Immunochemistry*, 2nd édition. C. C. Thomas, Springfield, U. S. A., 1961, : 905.
21. PICK (E.) et NELKEN (D.). — Bismuth tannate test. *Nature*, 1963, **197**, 157-8.
22. GILBOA-GARBER (N.) et NELKEN (D.). — Barium sulphate test. *Nature*, 1963, **197**, 158-9.
23. PROVOST (A.) et QUEVAL (R.). — Note sur l'hétérohémagglutination des hématies de chèvre par les sérums de zébu. *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, **105**, (1) 109-10.