

TRAVAUX ORIGINAUX

Possibilité de diagnostic sérologique de la maladie de Newcastle sur le cadavre

par J. RAMISSE et E. RAKOTONDRAMARY

RÉSUMÉ

Pour diagnostiquer post-mortem la maladie de Newcastle nous nous sommes servis de trois techniques :

L'immunodiffusion et l'hémagglutination n'ont pas donné de résultats positifs et spécifiques.

L'inhibition de l'hémagglutination nous a fourni des résultats intéressants. Les titres IHA deviennent positifs à partir du 5-6^e jour après l'infection. La réaction peut-être pratiquée avec le caillot sanguin hémolysé.

Le diagnostic nécropsique de la maladie de Newcastle est parfois délicat. Les lésions hémorragiques du ventricule succenturié, de l'intestin, ou des coecums peuvent être inconstantes, très discrètes, ou confondues avec une irritation parasitaire. L'examen histopathologique du cerveau montre assez souvent une hyperémie congestive, mais ceci ne permet pas de conclure catégoriquement.

C'est pourquoi il faut faire appel, pour compléter les observations d'autopsie, aux techniques virologiques ou sérologiques. Le choix de la technique ou des modalités pratiques peut varier selon qu'il s'agit de sujets vivants (malades et porteurs), ou morts.

En vue de préciser le diagnostic *post-mortem*, nous avons expérimenté simultanément trois tests : l'hémagglutination (HA), l'inhibition de l'hémagglutination (IHA), et l'immunodiffusion.

Pour l'IHA nous avons apporté une modification : étant donné l'impossibilité de recueillir du sérum sur le cadavre, nous avons pensé à utiliser le caillot sanguin après hémolyse en eau distillée. Des vérifications expérimentales nous ont montré que cette technique était valable. Nous avons pour cela examiné des caillots prélevés sur des poulets morts d'infection

naturelle, mais surtout provenant de poulets inoculés expérimentalement et sur lesquels nous avons fait plusieurs fois des prises de sang.

Ces tests échelonnés pendant l'évolution de la maladie nous ont permis de voir les limites de leur application, ainsi que la date d'apparition des résultats positifs. Nous avons pu en déduire des conclusions pour le diagnostic post-mortem de la maladie.

Les prélèvements recueillis ont été utilisés de la manière suivante :

— Pour la réaction d'hémagglutination directe, nous nous sommes servis du caillot sanguin hémolysé, du contenu de l'œil, d'extrait tissulaire de rate, de rein, de cerveau, de poumon. Le caillot sanguin récolté sur le cadavre ou provenant de prises de sang sur des malades, est trituré au mortier en présence d'eau distillée (1 volume de sang, 3 ou 4 volumes d'eau). La suspension est ensuite centrifugée à faible vitesse pour éliminer les débris globulaires. Le surnageant équivaut approximativement au sang dilué au 1/4 ou au 1/5^e. Les extraits tissulaires sont préparés en broyant les organes au mortier en présence d'eau physiologique ou d'eau distillée. La suspension est centrifugée. On garde le surnageant qui est à la dilution 1/5^e au 1/10^e.

— Pour l'inhibition de l'hémagglutination nous n'avons employé que le caillot hémolysé.

— Pour l'immunodiffusion, nous avons choisi les broyats ou suspensions de rate, rein, cerveau et poumon. Les broyats s'obtiennent en hachant finement les viscères à la lame de rasoir, puis en les triturant si nécessaire au mortier. Les suspensions correspondent aux broyats dilués en tampon physiologique.

Nous avons opéré avec un virus moyennement virulent, et faiblement hémagglutinant, ainsi qu'avec un virus très hémagglutinant pour l'IHA.

Résultats obtenus avec l'immunodiffusion.

Il existe des anticorps spécifiques précipitants anti-Newcastle dans un certain pourcentage de sérums de poulets infectés ou hyperimmuns (DARBYSHIRE-2, LANCASTER-3). Nous avons recherché l'antigène correspondant dans les broyats tissulaires de sujets infectés.

1) *Méthode* : L'antisérum précipitant provient de poulets hyperimmunisés. Le mélange des sérums individuels possède un titre IHA de 1/8192. La diffusion se fait en plaque d'agar à la température du Laboratoire. Les broyats à examiner sont disposés dans les cuvettes périphériques entourant la cuvette centrale contenant l'antisérum. Nous ajoutons un témoin positif : du liquide allantoïdien virulent, et un négatif : du liquide allantoïdien normal. Nous avons varié les tampons, les pH, la qualité de l'agar.

2) *Résultats* : Le témoin positif donne en 3-4 jours une ligne nette de précipitation. Le liquide allantoïdien normal ne réagit pas. Les broyats et suspensions d'organes provenant de poulets infectés ne nous ont jamais donné de réaction positive. Pourtant, dans certains cas, les organes ont été prélevés assez précocement après l'infection (4-5 j.). A cette date il n'y avait pas encore d'anticorps inhibiteurs de l'HA dans le sang. A noter que la diffusion des pigments sanguins autour des cuvettes ne facilite pas la lecture.

Résultats obtenus avec l'hémagglutination directe.

Le pouvoir hémagglutinant spécifique est fonction de la quantité de virus contenu dans les

tissus. Selon LANCASTER (3), les organes les plus riches en virus sont les poumons, la rate, le cerveau. Outre ces organes, nous avons également examiné le caillot hémolysé et le contenu oculaire.

1) *Méthode*. Les extraits et liquides biologiques suspects sont dilués en tampon physiologique, de 1/2 en 1/2, à partir du 1/8^e ou du 1/10^e. On ajoute un égal volume d'une suspension fraîche d'hématies de poule à 0,5 p. 100. La sédimentation se fait en 2-3 h à + 4 °C ou à 20 °C.

2) *Résultats*. Ils sont très peu significatifs. Avec le sang hémolysé (168 examens), quel que soit le stade d'évolution de la maladie, nous n'avons jamais observé d'hémagglutination à partir du 1/8^e. Avec l'extrait de rate, la réaction est à peu près régulièrement négative, exception faite de quelques échantillons agglutinant jusqu'au 1/20^e. Etant donné l'inconstance d'une réaction positive, nous ne pouvons pas la considérer comme spécifique. Avec les autres extraits organiques, les résultats ne sont pas fidèlement reproductibles. De plus les extraits d'organes normaux non infectés donnent assez souvent des réactions positives (notamment l'extrait de rein, et le contenu oculaire).

Résultats obtenus avec l'inhibition de l'hémagglutination.

Nous avons pratiqué cette réaction avec le caillot hémolysé.

1) *Méthode et conditions d'application*. Le sang hémolysé est utilisé le jour même, ou conservé en chambre froide. On peut se servir également de sang hémolysé par congélation à - 30 °C. Nous avons remarqué que les hématies sédimentaient mieux dans le sang hémolysé que dans le sérum.

Nous titrons le pouvoir hémagglutinant du virus, et le même jour, nous faisons la réaction d'IHA. Les dilutions sont faites en tampon physiologique de pH 7-7,2.

Le schéma de la réaction est indiqué dans le tableau I.

Pour que la réaction d'IHA soit correctement réalisée, un certain nombre de conditions sont à respecter :

TABLEAU N°I

Protocole de l'inhibition de l'hémagglutination

Dilutions du sang hémolysé à titrer										T é m o i n s					
Sang hémolysé	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024					1/4	
Volume Sang hémolysé	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25				0,5	
Virus 16 u/ml Virus 4 u/ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25 (au 1/2)	0,25 (au 1/2)	0,25 (au 1/2)		
Tampon physiologique											0,25	0,25	0,25	0,25	0,5
laisser 30 minutes à la température ambiante (20 à 25° C)															
hématies 0,5 p. 100	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution finale	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096		4 UHA	2 UHA	1 UHA	1/2UHA	T.S.H. T.H.

Porter 2 à 3 h. à + 4° C avant de faire la lecture.

T.S.H. = témoin sang hémolysé
T.H. = témoin hématies
U.H.A. = Unité hémagglutinante

a) *Sélection d'hématies agglutinables.*

Toutes les hématies de poules ou de poulets ne sont pas également agglutinables par le virus de Newcastle. Il existe des différences selon les sujets, et aussi selon l'âge.

— Différences selon les sujets: Dans un groupe de poulets du même âge, les uns ont des hématies très agglutinables, les autres des hématies peu ou pas agglutinables. La proportion est aux environs de 50 p. 100. Avec un même virus, le titre hémagglutinant a varié de 8 UHA à 4.096 UHA, selon les hématies utilisées, toutes les conditions étant identiques par ailleurs. Cette constatation impose de bien sélectionner les poulets donneurs avant d'entreprendre les réactions.

— Différences selon l'âge : Les hématies de poulets de plus de 3-4 mois ou de poules adultes sont plus agglutinables que celles de jeunes poulets. La vaccination anti-Newcastle ne semble pas intervenir pour modifier l'agglutinabilité.

Avec un même virus nous avons testé plusieurs lots d'hématies provenant :

- de poulets de 1 mois non vaccinés,
- de poulets de 2 mois vaccinés,
- de poulets de 4 mois vaccinés,
- de poulets de 6 mois hyperimmunisés.

Les résultats sont relatés tableau n° II : Agglutinabilité des hématies.

TABLEAU N°II
Agglutinabilité des hématies

Dilutions Virus HA \ Age des poulets	Poulets d'1 mois non vaccinés	Poulets de 2 mois vaccinés	Poulets de 4 mois vaccinés	Poulets de 6 mois hyperimmunisés
1/1	-	1	-	-
1/8	4	1	1	1
1/16	-	2	1	-
1/32	3	-	-	-
1/64	2	1	-	-
1/128	1	-	1	1
1/256	-	2	-	1
1/512	-	-	-	1
1/1024	-	-	1	1
1/2048	-	1	3	-
1/4096	-	-	3	4

b) *Comparaison des hématies fraîches et formolées.*

Les hématies fraîches sont conservées sur Alsever, ou en suspension à 0,5 p. 100 en tampon physiologique, à + 4 °C. Les hématies formolées sont préparées selon la technique de CSIZMAS (1).

Nous avons comparé l'agglutinabilité d'hématies fraîches et formolées provenant de la même prise de sang. A plusieurs reprises nous avons constaté que les hématies formolées étaient beaucoup moins agglutinables par le virus de Newcastle que les hématies fraîches ; les différences allaient de 64 UHA avec les hématies formolées à 2.048 UHA avec les hématies

fraîches. Par la suite nous avons donc travaillé avec les hématies fraîches seulement.

c) *Choix d'un virus suffisamment hémagglutinant.*

Les hématies sont irrégulièrement agglutinables par un même virus, les variations ne sont pas moins importantes avec diverses souches de virus.

Nous avons comparé plusieurs fois, avec divers lots d'hématies, les titres hémagglutinants des souches virales en notre possession. Nous rapportons les résultats moyens — Tableau III : Titre HA des virus examinés.

TABLEAU N°III

Titre HA des virus examinés
(lecture après 2 h à + 4°C)

Souche virulente Malgache	256 UHA
Souche Ambatolampy	128 -
Souche passée sur perdrix	64 -
Souche Maurice	64 -
Souche Pakistan	64 -
Souche Mukteswar mésogénique	4096 -

Pour les épreuves d'IHA nous avons utilisé le virus-vaccin mésogénique qui est de loin le plus hémagglutinant.

d) *Sédimentation des hématies dans les sérums et les sangs hémolysés.*

Pour que les réactions d'HA et IHA aient une signification, il ne faut pas que ces hématies soient spontanément agglutinées dans le sérum ou le sang hémolysé, même aux plus faibles dilutions utilisées.

Or il arrive qu'avec certains sérums, les hématies soient agglutinées, et ceci jusqu'au 1/8^e ou 1/16^e. Les réactions d'HA et IHA risquent d'être perturbées. Ce pouvoir hémagglutinant non spécifique varie selon les sérums. Il existe aussi bien avec les sérums de poulets neufs qu'avec ceux de poulets vaccinés, ou hyperimmunisés, ou malades. L'inactivation par chauffage 30 minutes à 56 °C ne modifie pas régulièrement cette propriété.

Par contre dans le sang hémolysé, à la même dilution que le sérum, les hématies ne sont pas spontanément agglutinées. Soit un sérum dilué au 1/16^e qui hémagglutine d'une manière non spécifique, le sang représentant approximativement le double de volume du sérum, on peut considérer qu'au sérum dilué au 1/16^e correspond le sang hémolysé dilué au 1/8^e. Nous avons constaté que le sang hémolysé au 1/8^e n'hémagglutine pas, alors que le sérum au 1/16^e peut parfois agglutiner. La sédimentation paraît donc meilleure dans le sang hémolysé que dans le sérum.

D'autre part nous n'avons pas constaté d'inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination dans les sérums et sangs hémolysés normaux. Ces réactifs, qu'ils soient traités ou non au

périodate de potasse n'inhibent pas l'hémagglutination, tout au moins aux dilutions utilisées.

2) Résultats de l'IHA avec le sang hémolysé.

Les tests expérimentaux ont été réalisés sur des poulets neufs inoculés avec des doses variables de virus Newcastle virulent. Nous avons introduit le virus par la voie sous cutanée, ou par la voie nasale. Nous pensons que l'infection par voie nasale à faible dose se rapprochait davantage du mode d'infection naturelle. La DLM du virus est environ 10⁻⁶ pour des poulets de 2-3 mois. La durée d'évolution de la maladie est en moyenne de 5 à 7 jours.

Pour comparaison nous avons également recherché le titre IHA de sangs hémolysés provenant de poulets vaccinés.

Les poulets infectés expérimentalement ont été divisés en quatre groupes :

— deux groupes inoculés par voie sous cutanée :

L'un avec une dose massive de virus (1 ml de virus pur).

L'autre avec une dose faible de virus (1 ml de virus à 10⁻⁶).

— deux groupes inoculés par voie nasale :

L'un avec une dose élevée de virus (1 goutte de virus pur).

L'autre avec une dose plus faible (10 vaporisations de virus à 10⁻²).

Les titres inhibiteurs de l'HA ont été évalués sur tous les poulets avant l'inoculation, et sur un certain pourcentage au fur et à mesure de l'évolution de l'infection. Quelques poulets ont succombé à la ponction cardiaque en cours de maladie.

Les résultats des titrages sont classés dans le tableau IV. Pour chaque groupe de poulets, nous indiquons en fonction du temps :

— Le nombre de morts (P. C. = mort par ponction cardiaque) ;

— Le nombre de sangs hémolysés testés ;

— le nombre de positifs à l'IHA ;

— Les titres IHA minimum et maximum ;

— Le nombre de poulets résistants.

D'après ces résultats, il ressort que :

— Un certain pourcentage de poulets résistent à l'infection expérimentale, même lorsque la

TABLEAU N°14

Inhibition de l'héماغglutination (IHA) avec le sang hémolysé provenant de poulets expérimentalement infectés

Voie	Inoculation	Dose	Nombre de poulets	Résultats	Durée d'évolution de la maladie							
					Avant	4 ^e jour après inoculation	5 ^e jour après inoculation	6 ^e jour après inoculation	7 ^e jour après inoculation	8 ^e jour après inoculation	9 ^e -10 ^e jours après inoculation	suyvants
Sous cutanée.	1 ml	Virus pur	20	morts	0	5	3	2	0	3	6	3
				testés	tous	5	11	7	10	3	6	
				positifs	0	8	7	10	3	6		
				minimum et maximum Titres I H A		1/16-1/64	1/64-1/256	1/32-1/512	1/64-1/128	1/64-1/512		
Sous cutanée.	10-6	Virus à 1 ml	20	morts	0	3	8	0	0	3	3	
				testés	tous	9	14	3	3	3		
				positifs	0	6	11	3	3	3		
				minimum et maximum Titres I H A		1/16	1/16-1/32	1/256	1/512	1/1024		
nasale.	1 goutte	Virus pur	13	morts	2 (P.C.)	4	0	1	0	0		
				testés	tous	7	6	7	7	6		
				positifs	0	1	2	7	6	6		
				minimum et maximum Titres I H A		1/16	1/16-1/256	1/32-1/512	1/256	1/1024		
nasale.	10-2	Virus	20	morts	0	0	0	0	0	0		
				testés	tous	5	5	8	3	7		
				positifs	0	0	3	8	3	7		
				minimum et maximum Titres I H A		1/16-1/32	1/16	1/128	1/512	1/8192		
vaporisations	10	10-2	14/20	résistants	0	0	0	0	0	0		
				morts	0	0	1 (P.C.)	3	1 (P.C.)	0		
				testés	tous	5	5	8	3	7		
				positifs	0	0	3	8	3	7		

dose inoculée est forte. Pourtant ces poulets n'avaient pas d'anticorps IHA avant l'inoculation. La souche de virus ne paraît pas extrêmement virulente.

— Les poulets résistants ont un titre en anticorps IHA très élevé. On peut remarquer d'ailleurs que l'inoculation par voie nasale permet un développement nettement plus marqué des anticorps IHA.

— La mortalité maxima se situe vers le 5-6^e jour après l'inoculation. La durée d'évolution de la maladie varie peu quelles que soient la voie d'inoculation, ou la dose inoculée.

— Les anticorps IHA n'apparaissent qu'à partir du 5^e jour (inoculation sous cutanée), ou 6^e jour (inoculation voie nasale). C'est-à-dire au moment de la mortalité maxima. Ceci donne à penser que lors d'évolution suraiguë (souche très virulente), il n'y a pas d'anticorps décelables, et que par conséquent le diagnostic ne peut dans ce cas être établi par IHA. Le diagnostic par IHA *post-mortem* ne pourrait être fait, selon notre expérimentation, que si l'évolution de l'infection dure au moins 5 jours.

D'autre part pour appliquer valablement cette méthode, il faut savoir si les sujets ont été vaccinés et à quelle date. La vaccination fait apparaître des anticorps IHA. Nous avons évalué ces anticorps sur un lot de poulets vaccinés depuis 15 jours avec un virus vivant mésogénique inoculé en sous-cutanée. Les titres IHA allaient de 1/128^e à 1/1.024^e. Si l'on examine des poulets suspects mais ayant été vaccinés auparavant, le titre en anticorps IHA ne peut guère avoir de signification diagnostique.

CONCLUSIONS

Nous avons appliqué l'hémagglutination, l'immunodiffusion, et l'inhibition de l'hémagglutination au diagnostic de la maladie de Newcastle.

Les poulets soumis à l'examen ont été infectés expérimentalement. Le virus était moyennement virulent.

L'immunodiffusion avec des broyats tissulaires ne nous a donné que des résultats négatifs.

L'hémagglutination avec des extraits d'organes et de sang hémolysé n'a fourni aucun renseignement utile, car elle est demeurée négative ou non spécifique.

Par contre, avec l'inhibition de l'hémagglutination pratiquée sur les sangs hémolysés, nous avons obtenu des réponses significatives et constantes. Avant l'inoculation, l'IHA est habituellement négative. Les anticorps spécifiques apparaissent vers le 5-6^e jours après l'infection. Ils sont décelables au moment de la mortalité maxima et peuvent servir de ce fait au diagnostic *post-mortem* sous réserve que les poulets n'aient pas été vaccinés.

Les limites d'application de l'IHA découlent des faits suivants :

— Si la mortalité est précoce (souches très virulentes) il n'y a pas d'anticorps. Peut-être dans ce cas est-il possible de faire appel à l'hémagglutination ?

— Les sujets vaccinés élaborent des anticorps IHA qui ne peuvent être différenciés des anticorps induits par l'infection.

*Institut d'Elevage et de Médecine
vétérinaire des Pays tropicaux.
Laboratoire central de l'Elevage de
Tananarive.*

SUMMARY

Post-mortem serological diagnosis of Newcastle Disease

Three methods have been used for the diagnosis of Newcastle Disease :

— Immunodiffusion and hemagglutination did not show positive and specific results.

— Hemagglutination inhibition test gave some interesting results. HIT became positive from 5 or 6 th day after infection. The reaction can be carried out with the hemolysed blood clot.

RESUMEN

Posibilidad de diagnóstico serológico post-mortem de la enfermedad de Newcastle

Se utilizaron tres técnicas para el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle :

La inmunodifusión y la hemaglutinación no dieron resultados positivos y específicos.

La inhibición de la hemaglutinación es interesante en cuanto a sus resultados. Los títulos de la inhibición de la hemaglutinación se hacen positivos a partir del 5º o del 6º día después de la infección. Se puede efectuar la reacción con el coágulo hemolizado.

BIBLIOGRAPHIE

1. CSIZMAS (L.). — Préparation d'hématies formolées. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1960, 103, 157.
2. DARBYSHIRE. — La technique de diffusion en gel dans l'étude des virus importants en Médecine Vétérinaire. *Vét. Bull.*, 1964, 34, 699.
3. LANCASTER. — Diagnostic de la maladie de Newcastle. *Vét. Bull.*, 1964, 33, 347.