

POUVOIR IMMUNIGENE ET DIFFUSIBILITE D'UN MUTANT FROID DE LA PESTE PORCINE CLASSIQUE UTILISE SUR LE TERRAIN

J.M. AYNAUD (1), C. TEXIER (2) *

(1) INRA Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie - 78850 Thiverval-Grignon

(2) ITP - Service Expérimentation - MNE - 149, rue de Bercy - 75579 Paris Cedex 12

I. INTRODUCTION

Des travaux antérieurs réalisés dans les conditions du laboratoire ont mis en évidence les propriétés *in vitro* et *in vivo* de mutants froids du virus de la peste porcine (1, 2, 8). Nous avons montré en particulier que les virus étudiés avaient perdu le pouvoir pathogène pour les porcelets de 20 à 25 Kg tout en gardant le pouvoir immunigène. La virémie est peu ou pas détectable et à partir des animaux vaccinés dans les conditions expérimentales et la dispersion du virus est nulle.

A partir de ces résultats, nous avons réalisé à plus grande échelle une expérience de vaccination sans sérum avec un des mêmes mutants (souche "THIVERVAL") sur 130 porcs à l'engrais placés dans les conditions de la pratique. Le but de ce travail était de tester sur le terrain l'efficacité à long terme de ce nouveau type de vaccin vivant utilisé sans sérum et de rechercher également l'éventualité de la dispersion du virus entre les animaux vaccinés et des animaux non vaccinés élevés au contact des précédents tout au long de la période d'engraissement.

Dans ce rapport, nous présentons les résultats obtenus concernant la durée et l'intensité de l'immunité mesurée par des tests de séroneutralisation en culture cellulaire ainsi que par des épreuves virulentes pratiquées à la fin de la période d'engraissement sur les animaux vaccinés et sur les animaux "témoins de contact".

II. MATERIEL ET METHODES

A - Le vaccin

Le vaccin vivant utilisé (lot n° 11.002) est produit à partir du clone U.610 isolé en culture cellulaire à basse température. Le vaccin est préparé sur des cultures primaires de cellules musculaires d'embryon de veau incubées pendant 7 jours à 31°C. Après récolte et lyophilisation, chaque dose de vaccin reconstitué renferme 10^4 unités formant des plages de cellules fluorescentes.

B - Les animaux

Les animaux provenant de deux groupements de producteurs (AURILLAC et PAU) sont issus du croisement des races LANDRACE et LARGEWHITE. Les animaux proviennent de 26 élevages où la vaccination anti peste porcine n'est pas pratiquée. De ce fait, on peut penser qu'ils sont dépourvus d'immunité passive résiduelle d'origine colostrale au moment de la vaccination. La vaccination est pratiquée 15 jours après l'entrée en porcherie. Le vaccin est injecté par voie intramusculaire à 130 porcelets mâles castrés, d'un poids moyen de 32 kgs, répartis dans une même porcherie en dix loges de 16 animaux. L'alimentation est distribuée au sol en deux repas quotidiens.

La répartition des animaux est opérée de la façon suivante : chacune des loges renferme 13 animaux vaccinés au milieu desquels on place 3 animaux non vaccinés servant de "témoins de contact" en vue de rechercher la dispersion éventuelle du virus par contact des porcs vaccinés aux porcs témoins.

* Avec la collaboration technique de C. GALICHER, J. LOMBARD et L. CABOT

C - Etude de l'immunité

L'immunité est étudiée à l'aide de la recherche des anticorps neutralisants et de la recherche de la résistance à l'épreuve (tableau I).

En fin d'engraissement, un mois avant l'abattage normal, on prélève un animal vacciné et un témoin en vue d'une épreuve virulente pratiquée au lazaret de la Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie. Une corrélation étroite existe entre la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum et la résistance à l'épreuve virulente. Aussi pour évaluer l'immunité induite sans recourir à l'épreuve virulente, lors de l'abattage des animaux commercialisés, nous avons prélevé du sang sur chacun des porcs restants afin de rechercher et de mesurer en culture cellulaire l'activité neutralisante anti- peste porcine présente dans le sérum. L'activité neutralisante est alors exprimée par l'index de neutralisation représenté par le \log_{10} du rapport entre le titre du virus témoin et celui du virus neutralisé.

Dans ces conditions, à la fin de la période d'engraissement, nous avons recherché l'immunité acquise vis-à-vis du virus de la peste porcine par deux méthodes différentes.

III. RESULTATS

A - Etude de l'immunité anti peste porcine

A la suite de la vaccination pratiquée sans sérum, nous n'avons pas observé de modifications dans le comportement des animaux (appétit, signes cliniques, etc...); ce qui confirme les résultats relatifs à l'innocuité de ce virus, obtenus antérieurement dans les conditions expérimentales.

Concernant la durée et l'intensité de l'immunité induite à la suite de la vaccination, les résultats ont été les suivants : le tableau II présente les résultats obtenus à partir de l'étude des sérums de 107 animaux vaccinés, à l'aide de la technique de séroneutralisation en culture cellulaire, tandis que le tableau III présente les résultats obtenus à la suite de l'épreuve virulente pratiquée sur 9 animaux vaccinés. Sur 116 animaux vaccinés, 107 ont eu leur sérum analysé en séroneutralisation, tandis que 9 ont fait l'objet d'une épreuve. Que ce soit la recherche de l'activité neutralisante présente dans le sérum ou que ce soit la recherche de la résistance à l'épreuve, on constate que 100 % des animaux vaccinés ainsi testés, sont immunisés contre la peste porcine. En effet les séroneutralisations, révèlent que 83 % des sérums analysés possèdent une activité neutralisante dont l'index est égal ou supérieur à 5, tandis que 17 % possèdent une activité neutralisante dont l'index est compris entre 1 et 5.

Les épreuves virulentes montrent que 9 sur 9 des animaux vaccinés résistent parfaitement à l'injection de 10^6 doses du virus de la souche sauvage "ALFORT".

L'ensemble des recherches mises ainsi en œuvre pour déterminer l'immunité des animaux vaccinés nous montre que 100 % des animaux étudiés possèdent vers la fin de la période d'engraissement, c'est-à-dire vers 88 kg environ, une excellente immunité vis-à-vis du virus de la peste porcine.

B - Etude de la transmission du virus vaccinal des animaux vaccinés à des animaux "témoins de contact".

Sur l'ensemble des 26 animaux "témoins de contact" étudiés, 17 ont eu leur sérum analysé par séroneutralisation en culture cellulaire, tandis que 9 ont fait l'objet d'une épreuve virulente avec le virus sauvage "ALFORT".

Concernant les séroneutralisations, les résultats présentés dans le tableau II indiquent que seulement 2 animaux sur 17 se sont révélés immunisés, comme en témoigne l'importante activité neutralisante (index de 5 et au-dessus) décelée dans leur sérum. Par contre les 15 autres animaux non immunisés possèdent un sérum dont l'activité neutralisante n'a pas pu être décelable dans les conditions choisies.

Concernant l'épreuve virulente, le tableau III présente les résultats obtenus dont il ressort que 3 animaux sur les 9 testés, se sont révélés capables de résister à l'inoculation de 10^6 doses du virus de la souche sauvage "ALFORT". Il faut remarquer que parmi les 3 animaux résistants, deux ont présenté de l'hypothermie modérée et de l'anorexie durant la période d'observation.

Les recherches mises en œuvre pour déceler l'éventuelle transmission du virus des animaux vaccinés à des animaux "témoins de contact" permettent donc d'établir que 5 animaux sur 26, soit 19% , se sont immunisés au contact des animaux vaccinés au cours des 4 à 5 mois de la période d'engraissement.

IV - DISCUSSION

- De ces résultats, on peut tirer les deux conclusions suivantes :

- Les renseignements fournis par la recherche des anticorps neutralisants sériques ou par l'épreuve virulente avec la souche "ALFORT" montrent que l'immunité induite est solide (index de neutralisation élevé et excellente résistance à l'épreuve des animaux vaccinés) et qu'elle dure au moins toute la vie économique des animaux.

- Un nombre limité (19%) d'animaux témoins ont acquis une immunité au contact des animaux vaccinés tout au long de la période d'engraissement.

- Notre discussion portera successivement sur les avantages et les inconvénients des techniques choisies pour étudier l'immunité anti peste porcine et sur la valeur et la signification des résultats obtenus :

a) Choix des techniques utilisées pour juger de la valeur de l'immunité anti peste porcine.

Nous avons recherché les anticorps neutralisants dans le sérum de 116 animaux tandis que 26 animaux seulement ont fait l'objet d'une épreuve virulente. Des raisons surtout pratiques et économiques ont orienté notre choix : l'épreuve virulente est plus sensible mais surtout elle représente un test permettant d'apprécier directement le pouvoir protecteur du vaccin. C'est toutefois un test laborieux, long et onéreux, nécessitant une installation rigoureusement isolée dont les capacités sont limitées surtout lorsque dans notre cas on s'adresse à des porcs de 100 Kg. L'étroite corrélation entre la présence des anticorps neutralisants dans les sérums et la protection, a conduit plusieurs équipes (6, 10, 12, 14, 16) à choisir la recherche des anticorps neutralisants pour étudier l'efficacité des vaccins contre la peste porcine expérimentés sur des nombres importants d'animaux. La recherche de l'activité neutralisante présente dans le sérum à l'aide de la séroneutralisation en culture cellulaire présente de grands avantages pratiques et économiques. En effet lors d'expériences à une grande échelle sur le terrain, il est possible grâce à cette technique *in vitro* d'analyser un très grand nombre de sérums en un minimum de temps. Les résultats qui sont obtenus en 24 heures fournissent des renseignements à caractères quantitatifs.

b) Caractères de l'immunité induite

L'immunité obtenue est d'excellente qualité. En effet à la fin de la période d'engraissement 93% des animaux testés ont un sérum (1/20) dont l'index de neutralisation est égal ou supérieur à 3. De plus tous les animaux vaccinés soumis à l'épreuve virulente ont parfaitement résisté sans manifester de réactions. Nos résultats montrent que le mutant (souche "THIVERVAL") utilisé dans ces expériences sur le terrain possède un bon pouvoir immunigène pour des porcs à l'engrais.

c) Transmission horizontale du virus des animaux vaccinés aux animaux témoins "de contact".

Non seulement le virus peut être transmis expérimentalement de porc à porc, mais on assiste pour certains vaccins à une réactivation progressive du pouvoir pathogène. On sait également que des virus-vaccins peuvent se transmettre simplement par contact des porcs vaccinés à des porcs sensibles (3, 5, 9, 10). Ainsi ZINOBER en 1968 (16) au cours d'un travail portant sur 33 souches de vaccin, réussit avec 27 d'entre elles à transmettre par contact, dans les conditions expérimentales, l'immunité des porcs vaccinés à des porcs sensibles. Dans certains cas, la réactivation de la virulence que l'on observe est en rapport avec l'hétérogénéité génétique de la population du virus constituant le vaccin vivant.

Pour être inoffensif, un vaccin vivant doit être non seulement incapable de se réactiver, mais devrait également être dans l'impossibilité de diffuser hors de l'organisme vacciné. C'est dans cette optique que nous nous sommes efforcés de mettre au point un vaccin vivant génétiquement homogène et inoffensif, en sélectionnant en culture cellulaire à basse température un clone de virus "froid" et "fragile" (2, 8). "Froid" pour limiter sa multiplication dans l'organisme dont la température est de 39,5°C, "fragile" pour favoriser son inactivation hors de l'organisme. Deux expériences conduites précédemment dans les conditions du laboratoire sur un nombre réduit (7 et 12) d'animaux ont parfaitement démontré la non diffusibilité du virus de la souche "THIVERVAL", des animaux vaccinés à des animaux témoins de contact. Dans les conditions expérimentales on n'observe donc pas de diffusion du virus vaccinal.

Par ailleurs nous avons également démontré (résultats non publiés) qu'il n'est pas possible de transmettre le virus vaccinal au cours de passages en série de porcs vaccinés à des porcs sensibles à partir du sang prélevé 5 à 7 jours après la vaccination. Ces résultats obtenus dans les conditions expérimentales, suggèrent que la virémie n'est pas détectable et que la diffusion du virus est nulle.

Nous avons alors voulu confirmer ces résultats en réalisant sur le terrain à une plus grande échelle, l'expérience décrite dans ce rapport. Bien que possédant le caractère "fragile" le virus utilisé parvient à diffuser hors de l'organisme dans un nombre limité de cas, puisque 19% des porcs "témoins de contact" se révèlent être immunisés après 4 à 5 mois de cohabitation sans que l'on observe une quelconque réactivation du pouvoir pathogène. Il existe donc une différence entre les résultats obtenus après un mois de contact dans les conditions expérimentales et ceux obtenus après 4 à 5 mois de cohabitation sur le terrain dans les conditions normales de la pratique. Dans ce dernier cas, le nombre plus important d'animaux (160 au lieu de 7 et 12), la cohabitation de 4 à 5 mois au lieu d'un, des erreurs toujours possibles au niveau de l'identification des animaux, peuvent expliquer les différences observées dans les résultats. De telles différences ont par ailleurs été observées antérieurement dans le cas de la couche lapinisée "chinoise" par BOGNAR en 1963 (3) ou par PRECAUSTA en 1971 (5, 9). Même pour des souches de vaccin vivant reconnues inoffensives comme la souche "chinoise" ou la souche GPE (12) caractérisée *in vitro* comme un virus "froid" et "fragile" (2), les divers auteurs ont observé la transmission horizontale du virus immunisant par contact (3, 5, 9) et également au cours des passages en série de porc à porc, à partir du sang virulent prélevé sur les porcs 5 à 7 jours après la vaccination (4, 11, 13) sans que l'on observe une quelconque réactivation de la virulence. Dans notre cas, les résultats obtenus démontrent que la diffusion du virus immunisant est donc limitée puisque d'une part sur le terrain 19% seulement des témoins de contact sont immunisés et que d'autre part nous n'avons pas réussi à transmettre le virus au cours des passages en série de porc à porc.

Les résultats suggèrent que du virus vaccinal infectieux, non seulement persiste assez longtemps chez quelques animaux vaccinés, mais encore est excrété en quantité suffisante pour immuniser 19% des animaux sensibles placés en cohabitation au milieu des animaux vaccinés.

Comment peut-on concevoir la persistance du virus chez un animal vacciné et quel en est le siège ?

Les amygdales, situées dans une région largement ventilée, sont le siège de la multiplication active et précoce des souches de vaccins vivants anti peste porcine. Dans ces conditions on peut supposer que la souche "THIVERVAL" puisse trouver au niveau des cellules des amygdales des conditions favorables à son développement. Il reste toutefois à déterminer quels sont le ou les facteurs qui favorisent la persistance du virus vaccinal dans notre cas ou dans celui de la souche "chinoise" et son excrétion à l'extérieur de l'organisme. Cette hypothèse reste à vérifier et pourrait conduire à mettre sur pied une nouvelle expérimentation dans le but d'identifier les animaux vaccinés où persiste le virus, la durée de la persistance du virus au niveau des amygdales et les modalités de son excrétion.

Enfin les différences observées entre les résultats obtenus au laboratoire et ceux obtenus sur le terrain à une plus grande échelle soulignent à nouveau l'intérêt des expérimentations conduites dans les conditions normales de la pratique sur un nombre assez important d'animaux pour juger de l'efficacité ou de l'innocuité des souches de virus proposées comme vaccin vivant.

TABLEAU 1
PROTOCOLE EXPERIMENTAL

	NOMBRE D'ANIMAUX	NOMBRE D'ANIMAUX DONT LES SERUMS ONT FAIT L'OBJET D'UNE RECHERCHE D'ANTICORPS NEUTRALISANT LE VIRUS DE LA P.P.C.	NOMBRE D'ANIMAUX AYANT ETE SOUMIS A L'EPREUVE VIRULENTE (souche ALFORT)	ANIMAUX NON DETERMINES
ANIMAUX VACCINES	130	107	9	14*
ANIMAUX TEMOINS DE CONTACT	30	17	9	4**

* 4 animaux morts en cours d'expérience et 10 sérums égarés

** 4 animaux morts en cours d'expérience.

TABLEAU II

ETUDE DU POUVOIR IMMUNIGENE DE LA SOUCHE "THIVERVAL"

a) Recherche des anticorps neutralisant le virus de la peste porcine dans le sérum des animaux lors de l'abattage vers 100 Kg.

	INDEX DE NEUTRALISATION VIS-A-VIS DU VIRUS SAUVAGE (souche ALFORT). sérum dilués au 1/20*								
	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5 et >
ANIMAUX VACCINES (107)	0	1	1	2	1	6	1	5	90
	0 %	17 %							83 %
ANIMAUX TEMOINS DE CONTACT (17)	15	0	0	0	0	0	0	0	2
	88 %	0 %							12 %

* Des index de neutralisation (sérum au 1/20) de 1 et de 5, correspondent dans la méthode "sérum variable-virus constant (100 à 200 U.F.P.)" respectivement à des valeurs moyennes de 1/80 et de 1/5000 environ.

TABLEAU III

ETUDE DU POUVOIR IMMUNIGENE DE LA SOUCHE "THIVERVAL"

b) Recherche de la résistance à l'épreuve virulente (souche Alfort) chez des animaux en fin d'engraissement.

EPREUVE

	NOMBRE D' ANIMAUX	NOMBRE DE MORTS	NOMBRE DE MALADES *	NOMBRE DE RESISTANTS **	NOMBRE D'ANIMAUX IMMUNISES
VACCINES	9	0	0	9	9 / 9
TEMOINS DE CONTACT	9	6	2	1	3 / 9

* hyperthermie, anorexie

** rien à signaler.

TABLEAU IV

RESULTATS GLOBAUX

	NOMBRE TOTAL D'ANIMAUX EN EXPERIMENTATION	NOMBRE D'ANIMAUX DONT ON A RECHERCHE L'IMMUNITE ANTI PESTE PORCINE	NOMBRE D'ANIMAUX IMMUNISES CONTRE LA PESTE PORCINE
ANIMAUX VACCINES	130	116	116 soit 100 %
ANIMAUX TEMOINS DE CONTACT	30	26	5 soit 19 %

BIBLIOGRAPHIE

1. J.M. AYNAUD, J.C. LEJOLLY, C. BIBARD, C. GALICHER : Etude des propriétés de mutants froids du virus de la peste porcine classique. Application dans la vaccination.
Bull. Off. Int. Epiz., 1971, **75**, 654.
2. J.M. AYNAUD, C. GALICHER, J. LOMBARD, C. BIBARD., M. MIERZEJEWSKA. : Peste porcine classique : les facteurs d'identification *in vitro* (marqueurs génétiques) du virus en relation avec le pouvoir pathogène du proc.
Ann. Rech. Vet., 1972, **3**, 209.
3. K. BOGNAR, J. MESZAROS. : Experience with a lapinized hog cholera virus strain of decreased virulence.
Acta. Veter. Acad. Sci. Hung., 1963, **13**, 429
4. L. BRAN, S. MIHAITA, M. POPA, N. TOTORCEA, T. ALBU. : Sur la stabilité de quelques caractères biologiques de la souche "C" du virus lapinisé de la peste porcine.
Bull. Off. Int. Epiz., 1966, **66**, 681.
5. P. GORET, P. PRECAUSTA, F. PERRENOT. : Etude d'un virus-vaccin modifié contre la peste porcine classique préparé à partir d'une souche "chinoise" adaptée à la culture de cellules rénales d'agneau.
Rec. Med. Vet., 1971, **147**, 937.
6. M. GUALTIERE, L. ROSSI, A. PELLICIONI. : Anticorpi neutralizzanti nel sangue di mariali vaccinati contro la peste suina e macellati normalmente.
Atti della Societa Italiana delle Scienze veterinarie, 1970, **24**, 650.
7. H. JANOWSKI, J. ZADURA, K. WASINSKI. : Immunobiological properties of the chinese lapinized hog cholera virus strain.
III. Dissemination of the strain through the meat of vaccinated pigs.
Bull. of the Veterinary Institute in Pulawy, 1964, **8**, 93.
8. M. LAUNAIS, J.M. AYNAUD, G. CORTIER : Peste porcine classique : propriétés d'un clone (souche "THIVERVAL") isolé à basse température en culture cellulaire. Application dans la vaccination.
A paraître dans la Revue Médecine Vétérinaire, 1973 (sous presse)
9. E. LEFTHERIOTIS, P. PRECAUSTA, F. CAILLIERE. : Etude d'une souche modifiée de virus de la peste porcine adaptée à la culture cellulaire de rein de mouton et son utilisation comme virus-vaccin.
Rev. Med. Vet., 1971, **122**, 33.
10. H. LIEBKE, G. KORN, W. MATTHAEUS. : Uber experimentelle untersuchungen mit dem schweinepest lebendimpfstoff "Sulferin" (Behringwerke).
37è session générale du Comité de l'O.I.E., Paris, 19-24 Mai 1969.
11. A. OKANIWA, M. NAKAGAWA, Y. SHIMIZU, S. FURUUCHI. : Lesions in swine inoculated with attenuated hog cholera viruses.
Nat. Inst. Anim. Health Quarterly., 1969, **9**, 92.
12. J. SASAHARA, T. KUMAGAI, Y. SHIMIZU, S. FURUUCHI. : Field experiments of hog cholera live vaccine prepared in guinea-pig Kidney cell culture.
Nat. Inst. Anim. Health Quarterly, 1969, **9**, 83.
13. J. THOMAS : Stabilité génétique et atténuation du vaccin peste porcine souche "chinoise" Rapport de recherches de l'Institut National de Recherches Vétérinaires. Uccle - Bruxelles - 1966.
14. V. TORLONE, F. TITOLI, L. GIALLETTI. : Efficacia del vaccinio lapinizzato, ceppo cinese contro la peste suina.
Veterinaria. Ital., 1967, **18**, 403.
15. J.P. TORREY. : Studies on modified virus vaccine for hog cholera.
II Reactivation by serial passage.
Proc. U.S. Livestock. San. Ass. 64 th Ann. Meeting. 1960, 298.
16. M.R. ZINOBER, L.O. MOTT. : Spreading characteristics of commercial hog cholera modified live virus vaccines in swine.
II. *In vitro* serum neutralization studies.
Proc. U.S. Livestock. San. Ass., 72 nd Ann. Meeting. 1968, 297.