

155

08810

REPUBLIQUE DU SENEGAL

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLAS (I.S.R.A.)

UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI

DELEGATION GENERALE A LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

DEPARTEMENT DE RECHERCHES
ZOOTECNIQUES ET VETERINAIRES

RAPPORT ANNUEL
SUR LES RECHERCHES DE VIROLOGIE
1979

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELUVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
S. N. 2097

Février 1980

DNA - 200

08810

REPUBLIQUE DU SENEGAL

UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI

DELEGATION GENERALE A LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (I.S.R.A.)

DEPARTEMENT DE RECHERCHES
ZOOTECNIQUES ET VETERINAIRES

RAPPORT ANNUEL
SUR LES RECHERCHES DE VIROLOGIE
1979

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
B.P. 2057

DAKAR - HANN

Février 1980

MALADIES VIRALES

- Etude de la Fièvre aphteuse (ISRA 38 - P. BOURDIN)

La Fièvre aphteuse est signalée dans diverses régions. En 1979, les premiers foyers ont fait leur apparition au Sénégal-Oriental et en Haute Casamance, près de la frontière guinéenne, puis l'épizootie a suivi l'axe traditionnel de commercialisation du bétail, remontant vers Tambacounda, Kaffrine et Kaolack pour diffuser ensuite vers la région du Cap-Vert, Diourbel et le Ferlo.

Sur le plan clinique, les bovins de race Ndama sont assez peu sensibles. Après une période d'hyperthermie, suivie d'anorexie, on note la formation d'aphtes au niveau de la muqueuse buccale et entre les espaces interdigités. Ces lésions entraînent un arrêt de l'alimentation et des difficultés dans le déplacement, puis il en résulte une perte de poids. Après 8 à 15 jours, tout rentre dans l'ordre. Seuls quelques animaux très fragiles comme les veaux à la mamelle ou les vieilles vaches épuisées par de nombreuses gestations succombent. Des isolements du virus ont été faits à partir des aphtes et le typage, réalisé par le centre mondial de référence de Weybridge en Angleterre, a confirmé que le virus était du type SAT 2 comme en 1976.

- Etude de la Peste des Petits Ruminants (ISRA 38 - P. BOURDIN)

Le virus PPR adapté aux cellules rénales de fœtus de mouton sort des cellules par bourgeonnement et diffuse dans le milieu extérieur.

Cette sortie se fait lentement et le nombre d'unités virales par millilitre de milieu est faible. Pour accélérer la sortie et augmenter la quantité d'antigène, on a imaginé d'agir sur la tension superficielle au niveau de la membrane cellulaire en diminuant la pression osmotique du milieu.

Le tapis cellulaire constitué par des cellules d'épithélium rénal de fœtus de mouton est inoculé avec une suspension de virus PPR souche (45 G).

Le contact virus-cellules est maintenu pendant 1 heure puis, on ajoute le milieu d'entretien constitué par du Hanks Laye contenant 3 p.100 de bicarbonate de sodium à 55 p.1000 et 2 p.100 de sérum de veau.

Le 5ème jour, les boîtes inculées sont vidées, une partie reçoit une solution de Hanks Laye contenant 30 p.100 d'eau tridistillée, l'autre une solution de Hanks Laye normale. Les pressions osmotiques de chacune de ces solutions sont respectivement de 219 et 307 milliosmoles. Après 3 heures de contact, les solutions sont rejetées, le tapis est rincé avec une solution normale de Hanks Laye puis, on remet le milieu d'entretien habituel, Hanks Laye à 2 p.100 de sérum de veau et 3 p.100 de bicarbonate de sodium à 55 p.1000.

Le 12ème jour, après l'inoculation, les tapis cellulaires présentent des lésions typiques. Les virus des 2 lots de boîtes sont récoltés séparément et soumis au titrage sur cellules rénales de fœtus de mouton. Le titre de la suspension virale traitée par la solution hypotonique atteint $10^{4,7}$, celui de la suspension non traitée ne dépasse pas $10^{3,8}$. L'expérience serait à reprendre pour préciser la durée de contact de la solution hypotonique avec le tapis cellulaire et l'époque de son introduction sur le tapis.

- Etude de la Prophylaxie des Moutons de la Basse-Casamance (ISRA 38 - P. BOURDIN)

Les examens faits à partir de prélèvements d'animaux morts ou sacrifiés pendant la phase d'état de la paraplégie n'ont pas permis l'identification d'un agent pathogène. Les signes cliniques et le contexte épidémiologique sont en faveur d'une intoxication d'origine végétale. Dans cette optique, on a suspecté l'action de champignons, notamment de claviseps que l'on peut rencontrer sur les espèces de *paspalum* vivant dans les lieux humides et notamment dans les rizières. La recherche des ergots de claviseps sur les *paspalum* faite en février 1979 a été négative. On a suspecté également l'action du Sélénium contenu dans les feuilles de certaines espèces de *Morinda* bien appréciées par les moutons. Le dosage du Sélénium

dans les feuilles faites par l'INRA de Theix a donné 40 ppm ce qui est trop faible pour leur conférer un pouvoir toxique. Ce fait a été confirmé par l'absence de signe d'intoxication chez des moutons nourris pendant 15 jours avec des feuilles de Morinda.

- Etude de la Peste équine

Application du test ELISA à la recherche des anticorps chez les chevaux ayant eu un contact avec le virus de la Peste équine, souche vaccinale ou sauvage (ISRA 38 - P. BOURDIN)

MATERIEL ET METHODE

- Purification de l'antigène :

On utilise comme virus, la souche vaccinale S2 issue du type 9 sauvage, régulièrement isolé en zone sahélienne depuis 1966. Le virus cultivé sur cellules Vero en présence de 1 p.100 de serum de veau est récolté quand la lyse du tapis atteint 80 p.100 des cellules. Le pH de la suspension virulente est ajusté à 7,4 environ par l'introduction de bicarbonate de sodium. Après centrifugation à + 4°C pendant 1 heure à 4 000 tours minute, le surnageant est récolté. On introduit du PEG 6 000 à la concentration de 8 p.100 et le mélange est soumis à agitation lente pendant 1 heure à la température de la glace fondante. Le mélange est centrifugé à 4 000 tours minute pendant 15 minutes. Le culot est repris dans un tampon JBS à pH 7,4 à raison de 10 ml pour 100 ml de suspension au départ. Le tout est dialysé contre le PBS pendant 24 heures. Le contenu du sac à dialyse est à nouveau mélangé à du PEG 6 000 à la concentration de 3 p.100 dans les mêmes conditions que ci-dessus et après centrifugation, le culot est repris dans 1 ml de tampon PBS. Nouvelle dialyse pendant 48 heures et le contenu du sac réparti en microtubes est conservé à + 4°C en attendant son utilisation.

- Préparation du conjugué

Le conjugué composé de phosphatase alcaline type VII la chez Sigma et de gamma globuline de lapin anti-gamma globuline de cheval de chez

Miles, est préparé sur place, puis conservé à -20°C après filtration.

- Préparation des plaques

On utilise des microplaques à fond plat. Le traitement préalable à la glutaraldehyde à 1 p.100 n'apporte aucune amélioration. u

- Substrat

On utilise le para-nitrophenyl phosphate dilué en tampon bicarbonate à pH 9,8 contenant du chlorure de magnésium 10^{-3} Molaire. La réaction est arrêtée par la soude 0,5 N.

- Lecture

La lecture se fait par mesure de la densité optique à l'aide du photomètre de chez Dynatec.

- Résultats

Il convient d'abord de fixer 2 paramètres, la dilution du conjugué et celle de l'antigène.

Pour l'antigène, on a testé 4 lots. Selon les lots, la dilution optimum est soit au 1/200, soit au 1/400.

Pour le conjugué, un seul lot est testé, la dilution optimum est au 1/200.

En examinant 4 sérums positifs locaux et un sérum négatif venant d'un cheval né en France, on constate que le test ELISA permet de détecter la présence d'anticorps jusqu'à la dilution 1/160. Malheureusement, les cupules contenant le sérum négatif sont légèrement colorées ce qui indique un bruit de fond dû aux impuretés contenues dans l'antigène. Ce bruit de fond n'est pas amélioré par l'adjonction de gélatine à 0,5 p.100. Il ne pourra être éliminé qu'après la purification du virus par ultra-centrifugation sur gradient de saccharose, manipulation réalisable en 1980 quand l'Ins-

titut Pasteur disposera d'une ultra-centrifugeuse.

CULTURE DES LEUCOCYTES DE PORC (ISRA 38 - P. BOURDIN)

La culture des globules blancs de porc est utile pour la détection du virus de la Peste porcine africaine. Jusqu'à présent, elle se réalisait à partir de globules blancs prélevés sur sang hépariné et trop souvent contaminés par des hématies. Cet inconvénient peut être éliminé en centrifugeant le sang de porc hépariné en gradient de Télébrix 38 et Ficoll 400.

Le sang est récolté sur héparine à raison de 500 unités d'héparine pour 40 à 50 ml de sang.

Ce sang est dilué en CMFS à raison de 1/3 de sang, 2/3 de CMFS, puis déposé doucement sur Ficoll 400 Télébrix 38 (103 ml de Ficoll, 400 à 9 p.100 et 20 ml de Télébrix 38) le mélange doit être conservé à + 4°C.

Au moment de l'emploi à 25 ml de mélange Ficoll Télébrix, on ajoute 5 ml d'eau distillée, on agite. On met 10 ml de ce dernier mélange dans un tube à centrifuser de 45 ml en plastique puis on dépose tout doucement à la surface 20 ml du sang dilué en CMFS. Le tout est centrifugé 45 minutes à 1 500 tours minutes sans frein et après équilibrage précis.

Les hématies descendent au fond et au milieu du mélange Télébrix Ficoll eau distillée, on obtient un anneau de globules blancs. On élimine 5 ml de mélange et on prélève l'anneau par aspiration. On lave une fois les globules blancs en diluant dans du CMFS au minimum au 1/10, puis en centrifugeant 10 minutes à 2 000 tours par minute. On reprend le culot dans 10 ml de Hyla contenant 50 ml de sérum de porc et des antibiotiques en quantité suffisante. Le mélange est réparti en tubes ou boîtes plastiques et après 48 heures d'incubation, la culture est utilisable pour l'inoculation.

Cette méthode de culture des globules blancs peut également être employée pour les essais de cultures des rickettsies.

DIAGNOSTICS ET ANALYSES FAITS PAR
LE SERVICE DE VIROLOGIE

NOMBRE D'EXAMENS

Diagnostic virologique 15
Diagnostic sérologique peste petits Ruminants, Peste
équine 266

TABLEAU N° 1 : Diagnostic et recherche de virus à partir de produits
pathologiques.

Espèces	Nombre de prélèvements		Nature	Technique utilisée			Résultats
				Isolement	Sérologie	Inoculation	
Bovins	7	1	pus utérin	+			nitrite à Proteus
		1	ganglion	+	+		peste bovine
		5	selles veaux		-		absence de Rotavirus
Moutons	1		poumon	-			absence de virus
Chevaux	5		rate			-	absence de virus peste équine
Porc	2					-	pas le peste porcine africaine

.../...

DIAGNOSTIC ET EXAMENS SEROLOGIQUES

Espèces	Nombre de prélèvements	Nature	Technique d'examen		Résultats
			Fixation du complément	Séroneutralisation	
Chevaux	222	Sérums	222		Contrôle des anticorps fixant le complément avant et après vaccination. Séroconversion positive.
Caprins	44	Sérums		44	Présence d'anticorps pastique chez 60 p.100 des animaux.