

Etude épidémiologique et mise au point d'un kit de diagnostic sérologique de la maladie de Carré

Zékiba TARNAGDA¹, Aleftina Fedorovna KARICHEVA²

Résumé

Le diagnostic de la maladie de Carré reposait sur l'observation des symptômes cliniques de la maladie, le test sérologique par neutralisation et les analyses anatomo-pathologiques chez l'animal infecté. Exceptée la réaction de neutralisation qui, elle aussi est techniquement contraignante, ces tests ne sont ni assez rapides, ni suffisamment précis. Quant à la PCR, elle nécessite un plateau technique très spécifique et coûteux. L'objectif de cette étude est de préciser l'épidémiologie, les manifestations cliniques et la biologie de la maladie de Carré au Burkina Faso et en Ukraine en vue de mettre au point des outils techniquement fiables, précis et rapides de son diagnostic sérologique. Les résultats obtenus ont été les suivants: la prévalence de la maladie de Carré s'est accrue de 1,7 % en 1981 à 14,6 % en 1991. A Ouagadougou, en 1990, 17,5 % des chiens consultants étaient affectés par la maladie de Carré et 80 % de ces chiens malades étaient âgés de 3 à 6 mois ; le virus sauvage de Carré a été isolé en culture cellulaire de rein de chiot, son titre infectieux par la méthode de REED et MUENCH est de $10^{-8,25}$ TCID₅₀/ml, celui de la souche vaccinale «EPM» est de 10^{-7} TCID₅₀/ml ; un kit diagnostique de la maladie de Carré a été mis au point : il est composé d'un antigène viral inactivé, préparé à l'aide de la souche « EPM » après irradiation pendant 10 heures aux rayons ultraviolets du laser LGN-113, Lvov et du sérum (anticorps polyclonaux dont les titres géométriques ont atteint 9Log2) obtenu après hyperimmunisation de lapins à l'antigène inactivé et adjuvé. Utilisé dans la réaction d'immunodiffusion en gel d'agar, le kit a atteint une sensibilité et une spécificité respectivement de 99,5 % IC = [96,4 – 100,0] et 100 % IC = [97,8 - 100,0]

Mots-clés : virus de Carré, canidés, kit diagnostique, immunodiffusion, antigène, anticorps.

Epidemiology and setting up of a serological diagnosis kit for canine distemper by agar gel immunodiffusion

Abstract

Canine distemper is a virosis of canidae like dog, fox, wolf, lion, hyena, and other carnivores. Its diagnosis was essentially based on neutralization test, clinical observation and anatomo-pathological analysis, which are not always specific and precise. Excepted neutralization test and PCR (labourious and costly), there is no other fast and precis diagnosis method. To lessen the impact of this problem, we have carried out an epidemiological, clinical and biological survey on canine distemper from 1990 to 1994, in

¹ Chargé de recherche, IRSS BP 545, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, Tél. /Fax: (226) 974868, zekiba@hotmail.com

² Professeur, chef de la chaire d'épidémiologie, microbiologie, virologie et immunologie de la faculté vétérinaire de l'institut agricole de Poltava, rue Skovorodi 3/1, Ukraine.

Burkina Faso and Ukraine in order to set up a laboratory diagnosis method of this disease. The results are as follows: Canine distemper prevalence has increased from 1.7 % in 1988 to 14.6 % in 1991 in Ouagadougou. At the veterinary clinic of Ouagadougou, 17.5 % of dogs were infected by canine distemper in 1990 and 80% of infected dogs had age range from three to six months ; The wild Carré's virus has been isolated in cellular culture of puppy's kidney. His infectious title according to REED and MUENCH method is $10^{8.25}$ TCID₅₀/ml; the infectious title of the vaccinal strain «EPM» is 10^7 TCID₅₀/ml; A viral inactivated antigen has been prepared from the vaccinal strain «EPM» after 10 hours irradiation to ultraviolet rays of the laser LGN-113, Lvov; A method of hyperimmunisation of rabbits by the inactivated and added antigen has been elaborated; polyclonal antibodies have been obtained and their geometric titles of which reach 9Log₂; A serological diagnosis method of canine distemper by immunodiffusion reaction in gel has been set up: the kit which sensitivity and specificity achieved 99,5 % CI = [96,4 – 100,0] and 100 % CI= [97,8 - 100,0] respectively is composed of the inactivated viral antigen and the precipitated hyperimmune serum.

Keywords: Carré's virus, canidaea, diagnosis kit, immunodiffusion, antigen, antibodies.

Introduction

La maladie de Carré est une maladie infectieuse des canidés dont l'agent causal est un virus de la famille des *paramyxoviridae* (Appel et Robson, 1973). Le virus de Carré est un virus à ARN (BARRET, 1999) et ses propriétés biologiques étudiées jusqu'alors n'ont pas permis l'utilisation des tests classiques de laboratoire pour poser le diagnostic précis de la maladie (TCHERKASKII, 1971). Les signes cliniques et les lésions anatomo-pathologiques des organes des animaux morts au début de l'infection ne sont pas toujours pathognomoniques (CARRE, 1905 ; APPEL et ROBSON, 1973 ; BARRET, 1999). Les symptômes de la maladie de Carré peuvent être similaires à ceux de l'entérite à parvovirus ou de l'hépatite virale des canidés. Plusieurs animaux (chien, loup, lion, hyène et autres carnivores) y compris le renard domestique dont la peau est utilisée par l'homme pour confectionner des vêtements en cuir, sont sensibles à la maladie de Carré (APATENKO, 1991). En Europe (Luxembourg, Allemagne et Espagne) et en Afrique de l'Est ce sont surtout les renards, les hyènes, les loups et les lions qui sont affectés (HEWICKER *et al.*, 1990 ; BLACK, 1991; LOPEZ-PENA *et al.*, 1994; ROELKE-PARKER, 1996 ; BENJAMIN *et al.*, 2002; BAMGARTNER *et al.*, 2003). Selon la FAO citée par TARNAGDA (1990), plus de 10 % de la population du Burkina Faso possède un chien en famille, ce qui porte à plus de 900 000 le nombre de chiens dans le pays. Malheureusement, nombreux sont ceux d'entre eux qui errent à la recherche d'aliments carnés dans les poubelles, représentant ainsi une source de dissémination de nombreuses maladies dont la maladie de Carré (BARRET, 1999). TCHERKASKII (1971), SOURIN et BELAOUSSOVA (1991) ont souligné que seule la réaction de neutralisation était utilisée pour le diagnostic de laboratoire de la maladie de Carré. De nos jours, la « polymérase chain reaction » (PCR) est une méthode utilisée pour le diagnostic de la maladie de Carré (FORSYTH *et al.*, 1995 ; BARRET, 1999). Mais la réaction de neutralisation et la PCR sont coûteuses et nécessitent un équipement sophistiqué. Ce qui les rend inaccessibles aux pays en développement. AFANACEV et LOGVINOV (1991) et OUCHTERLONY (1953) avaient cependant évoqué la présence d'anticorps précipitants chez des animaux atteints de la maladie de Carré. Ils avaient mis au point la réaction de précipitation pour la diagnostiquer. Mais la sensibilité et la spécificité de cette méthode étaient faibles : 55 % et 64 %. La mise au point d'un test rapide de diagnostic fiable et pratique de la maladie de Carré accessible aux pays en développement s'avère indispensable dans les programmes d'éradication de

cette maladie chez les canidés (AFANACEV et LOGVINOV, 1991 ; TARNAGDA, 1994). La présente étude a été menée de 1990 à 1994 et avait pour objectif de préciser l'épidémiologie, les manifestations cliniques et la biologie de la maladie de Carré en vue de mettre au point des outils techniquement fiables, précis et rapides de son diagnostic sérologique.

Matériel et méthodes

Ouagadougou, la capitale du Burkina Faso et Poltava, en Ukraine centrale, ont été les deux principaux sites d'étude.

Matériel

Virus et souches virales

Les souches virales utilisées étaient les suivantes : la souche virale «EPM» de Derofeev et Mételkin fournie par l'Institut de Recherche en Virologie de Moscou (Russie) ; la souche sauvage du virus de Carré a été isolée à partir des organes de chiens morts de la maladie de Carré ou d'animaux abattus après une anesthésie générale ; et dans ce cas l'abattage a été autorisé par les Associations de Protecteurs des Animaux de l'Ukraine.

Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés étaient des milieux naturels ou synthétiques disponibles dans le commerce, notamment à l'Institut de Recherche en Virologie de Moscou (Russie) : trypsine à 0,25 %, hydrolysate lactalbumine 0,5 %, milieu 199, glutamine, sérum fœtal de bovin, milieux usuels de bactériologie médicale. Certains milieux étaient issus de la firme Difco (USA) : milieu de Versan, milieu de Eagle et milieu de Henks.

Sérums spécifiques

Des sérums spécifiques contre le virus de Carré, le virus de l'entérite canine, le virus de l'hépatite canine ou le virus de la rage canine de l'Institut de Recherche en Virologie de Moscou ont été utilisés dans le test de neutralisation pour l'identification de la souche sauvage du virus de Carré isolée dans la présente étude.

Types de cultures cellulaires utilisées

La subculture obtenue, à partir des cultures cellulaires primaires de rein de chiot de moins de deux mois d'âge, et 400 œufs de poule embryon nés (de 8 à 9 jours) ont été utilisés pour l'isolement et les différents titrages des souches virales de la maladie de Carré.

Méthodes

Une étude du tableau clinique des différentes formes d'évolution de la maladie de Carré a été réalisée en examinant 267 chiens malades présentant des signes cliniques de la maladie (fièvre, inflammation des organes des voies respiratoires, une atteinte du tractus digestif et du système nerveux).

Obtention des cultures cellulaires

Les cultures cellulaires ont été préparées à partir des reins de chiots selon les recommandations de l'Institut Russe de Virologie Expérimentale, et par la méthode décrite par KARICHEVA et SOURIN (1980), SERGUEV et SABKO (1990). Les reins utilisés pour la culture cellulaire sont prélevés sur chiot de 1 à 2 mois d'âge après décapitation. La partie corticale du rein est découpée en petits morceaux (1- 3 mm) et suspendus dans une solution de trypsine (0, 25 %) dans un verre conique contenant un bâton aimanté. Le contenu du verre conique est ajusté dans une proportion de 150- 200 ml de trypsine pour 10 - 15 g de tissu rénal ; la suspension est incubée à 37 °C pendant 40 minutes. Après incubation, le contenu du cône est agité sur un agitateur magnétique pendant 15 à 20 minutes. La suspension obtenue est centrifugée à 1000 – 1500 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant est rejeté du tube et le dépôt cellulaire est suspendu dans un mélange à des proportions égales du milieu de Eagle (avec 10 % de glutamine), le milieu 199 et la solution d'hydrolysate de lactalbumine à 0, 5 %. La concentration des cellules dans la suspension est déterminée par lecture à la cellule de Gariaev (SERGUEV et SABKO, 1990). Les cellules sont suspendues dans des flacons de 110 à 120 ml dans le mélange des trois milieux sus-cités de façon à avoir 500 000 à 800 000 cellules par ml dans la solution ainsi constituée. Enfin 10 % de sérum fœtal de bovin est ajouté à la suspension cellulaire et les flacons sont fermés à l'aide de bouchons en caoutchouc et incubés à 37 °C. Une observation microscopique journalière a permis d'apprécier le caractère de la culture. Le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 heures. Le tapis cellulaire se formait aux 7^e et 8^e jours. A partir de la culture primaire de reins de chiots, la subculture a été obtenue en décollant les cellules des parois du flacon et en faisant agir un mélange de solution de Versan à 0,2 % et de trypsine à 0,25 % dans les proportions de 9 : 1 à la température de 37 °C. Les cellules obtenues sont centrifugées à 1000 - 1500 tours/ minute pendant 10 minutes avant d'être suspendues dans le mélange des trois milieux de culture en additionnant des antibiotiques, selon les doses déjà décrites plus haut. A la suspension de cellules, on a ajouté 10 % de sérum foetal de bovin avant la répartition dans des flacons de 110 - 120 ml. Les flacons contenant la suspension cellulaire sont incubés à 37 °C. Aux 3^e et 4^e jours, la subculture qui se présente alors sous forme de nappe cellulaire est prête pour être infectée par le virus (figure 1a).

Isolement de la souche sauvage du virus de Carré

Les organes (poumons, reins, foie et rate) des chiens morts de la maladie de Carré ont été prélevés dans les conditions du laboratoire afin d'y isoler la souche sauvage du virus. Ces organes ont été découpés en petits morceaux et écrasés contre du sable stérilisé. Le mélange obtenu a été dilué dans une solution de Henks dans la proportion 1 : 10. Le broyat a été congelé à -20 °C et décongelé à deux reprises. La suspension virale a été centrifugée à 500 tours/minute pendant 30 minutes. Le surnageant, additionné de 500 mg/ml de pénicilline et 500 UI/ml de streptomycine, a été conservé pendant 48 heures à +4 °C.

Toute contamination bactérienne ou fongique de la suspension obtenue est décelée en ensemençant les milieux suivants : eau peptonnée, gélose ordinaire, bouillon cœur cerveau et Sabouraud. Les échantillons de la suspension virale obtenue, indemnes de contaminations ont été inoculés sur cultures cellulaires et sur œufs de poule embryonnés. La présence de virus a été mise en évidence par l'effet cytopathogène sur cultures cellulaires et les modifications morphologiques sur œufs de poule embryonnés. Son identification a été faite par le test de neutralisation classique décrite par SOURIN et BELAOUSSOVA (1991).

Inactivation du virus de Carré à l'aide des rayons laser

La souche sauvage et la souche vaccinale «EPM» du virus de Carré ont été irradiées par des rayons infra-rouges (IR) et ultra-violets (UV) fournis par un appareil laser de marque LGN-113, Lvov (Ukraine). L'exposition des échantillons viraux aux rayons infrarouges a été effectuée à une longueur d'onde de 3,39 μm , un diamètre de 4 mm, pour une puissance de 2 MW. Par contre l'exposition aux rayons ultraviolets (UV) a été pratiquée à une longueur d'onde de 0,63 μm , à un diamètre de 4 mm, pour une puissance de 10 MW. Chacun des deux virus culturaux a été irradié séparément. Le contrôle du degré d'inactivation est obtenu en ensemençant les échantillons irradiés sur cultures cellulaires et sur œufs de poule embryonnés ; l'effet cytopathogène sur cultures cellulaires et les modifications morphologiques des œufs de poule embryonnés ont été appréciés.

Méthodes d'inoculation du virus de Carré

La suspension virale est introduite dans les flacons contenant le tapis cellulaire dans les proportions suivantes : 0,2 ml de suspension virale pour 0,8 ml de milieu d'entretien. Les cultures cellulaires infectées par le virus de Carré ont été incubées à l'étuve à la température de 37 °C pendant 40 minutes. Ensuite le milieu 199 a été ajouté dans tous les flacons avant d'être incubés une deuxième fois à 37 °C. L'effet cytopathogène a été apprécié 3 à 4 jours après l'inoculation, à l'aide d'un microscope optique inversé, au grossissement 40X.

Des œufs de poule embryonnés ont également été utilisés pour la culture du virus de Carré : le virus a été inoculé sur la membrane chorioallantoïdienne selon la méthode de LENNETO et SCHMID citée par KARICHEVA et SOURIN (1980). Les fenêtres d'inoculation ont été obturées avec de la paraffine. Les œufs ont été incubés à 37 °C dans une position horizontale sur un portoir. Les modifications morphologiques ont été observées aux 4^e et 5^e jours après l'inoculation.

Etude de l'effet cytopathogène

L'effet cytopathogène du virus a été observé quotidiennement au microscope 3 à 4 jours après l'inoculation: les cellules infectées deviennent rondes et volumineuses, le cytoplasme acquiert une structure granuleuse, le noyau s'élargit. Le stade final de l'effet cytopathogène se caractérise par la destruction des cellules infectées (figure 1b). Les modifications morphologiques des œufs infectés par le virus de Carré ont également été appréciées : la couleur, la consistance, la forme des extrémités du tissu embryonnaire et parfois la destruction de l'œuf par le virus.

L'immunisation des lapins avec les souches virales (inactivées ou non) et la mise au point du test rapide d'immunodiffusion en gel d'agar

Vingt lapins de la race Chinchilla d'un poids de 4 à 5 kg chacun et répartis en 5 groupes dont les quatre premiers ont été utilisés pour l'hyperimmunisation. Le cinquième groupe de lapins a servi de témoin. L'ordre d'administration et les doses d'antigènes utilisées sont indiqués dans le tableau II. Les deux premières séries d'injections d'antigènes (1^{er} et 7^e jours) ont été réalisées en intramusculaire. Les autres séries d'injections ont été faites en intraveineuse ou en intramusculaire. Aux lapins du cinquième groupe (témoin), nous avons administré une suspension de culture cellulaire non ensemençée de virus (pour s'assurer que les cultures cellulaires utilisées n'induisent aucune réaction immunitaire) selon les mêmes schémas et dosages que ceux précédemment

utilisés. L'adjuvant utilisé a été des huiles de vaseline et de lanoline. Les lapins immunisés ont été saignés six fois et les anticorps ont été recueillis.

Méthodes d'identification des virus : tests de neutralisation et d'immunodiffusion

L'identification du virus de Carré a été réalisée en utilisant respectivement le test de neutralisation et celui d'immunodiffusion dans un gel d'agar en boîtes de Pétri ou sur lame porte-objet à une concentration de 1 %, pH=7,1, à une température de 37 °C et une distance de 4-5 mm entre les cupules contenant antigène ou anticorps: agar Difco, agar de Kursk, agar oriental ou agar de Kharkov.

Titrage du virus de Carré

Le titrage du virus de Carré a été effectué par la méthode des TCID₅₀ (dose infectieuse 50 %) par la méthode de REED et MUENCH citée par SERGUEV et SABKO (1990) sur culture cellulaire et par la méthode des EID₅₀ de KERBER modifiée par ACHMARIN citée par SERGUEEV et SABCO (1990) sur œufs de poule embryonnés.

Éléments du kit de diagnostic de la maladie de Carré par immunodiffusion dans un gel d'agar et validation du test

Le kit de diagnostic comprend l'antigène viral inactivé concentré et les anticorps polyclonaux obtenus de lapins immunisés. Cinquante échantillons de sérums de chiens présentant des signes cliniques de la maladie de Carré ont été analysés à la clinique vétérinaire de Poltava (Ukraine) par le kit de diagnostic développé. Le même test a été utilisé pour dépister la maladie de Carré chez 416 renards de la ferme de Kabilak (Ukraine).

Analyse des données statistiques

Les données statistiques ont été analysées par le logiciel Epi-Info version 6.fr.

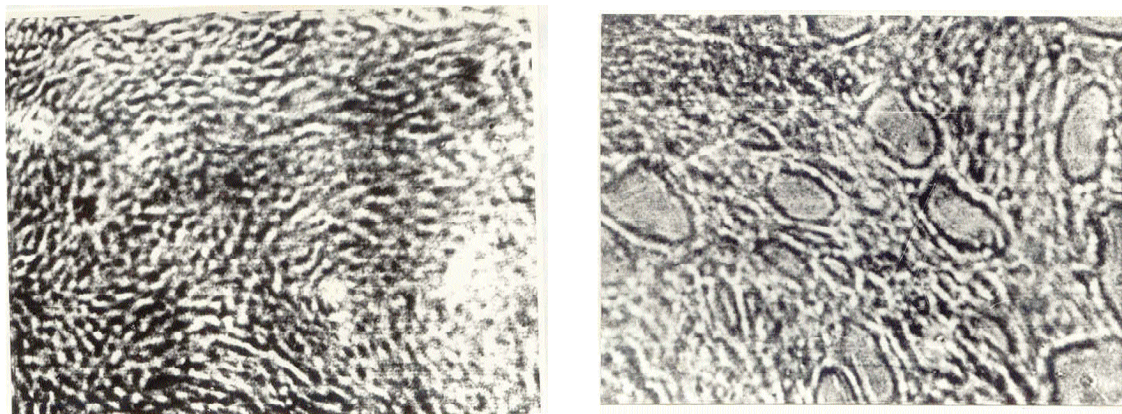


Figure 1. Tapis de cultures cellulaires primaires de reins de chiots

- a. Tapis Non infecté
- b. Effet cytopathogène du virus de Carré (souche sauvage) sur cultures cellulaires de reins de chiots au 4e jour après inoculation.

Résultats

La situation épidémiologique de la maladie de Carré au Burkina Faso

Le taux de morbidité de la maladie de Carré chez les chiens a progressé de 1981 à 1991 : 86/4847 (1,7 %) chiens étaient affectés par la maladie en 1981 et 712/4747 (14,6 %) chiens en 1991 ; 80 % de ces chiens malades étaient âgés de 3 à 6 mois. Le taux de morbidité le plus élevé pendant les dix dernières années (1981 à 1991) a été de 17,5 % (819/4552 chiens) en 1990. Un taux de mortalité de 39 % (80/206 chiens malades) a été enregistré en décembre 1990.

Tableau clinique selon les différentes formes d'évolution de la maladie de Carré

Les principales formes d'évolution de la maladie de Carré (formes cutanée, pulmonaire, intestinale, nerveuse et généralisée) ont été observées. Les données obtenues tant à Ouagadougou qu'à Poltava (Ukraine) ont été comparées (tableau I).

Tableau I. Données comparatives selon les différentes formes cliniques de la maladie de Carré dans une région chaude (Ouagadougou) et dans une région froide (Poltava) en 1990.

N° d'ordre	Différentes formes cliniques de la maladie de Carré	Ouagadougou (Burkina Faso)		Poltava (Ukraine)	
		Nombre de chiens malades	% de chiens malades	Nombre de chiens malades	% de chiens malades
1	Forme cutanée	30	26,08	2	1,31
2	Forme intestinale	60	52,17	70	46,05
3	Forme pulmonaire	12	10,43	50	32,89
4	Forme nerveuse	03	2,60	10	6,57
5	Forme généralisée	10	8,69	20	13,15
6	TOTAL	115	100	152	100

Isolement et identification de la souche sauvage du virus de Carré

La souche sauvage du virus de Carré ou souche épizootique isolée des organes de chiens morts par la présence effective d'effet cytopathogène sur cultures cellulaires (figure 1b) a été identifiée par le test de neutralisation. Des modifications morphologiques importantes ont été également observées sur des œufs de poule embryonnés. Son titre infectieux était de $10^{8,25}$ TCID₅₀/ml sur cultures cellulaires, alors qu'il était de $10^{5,33}$ EID₅₀/ml sur œufs de poule embryonnés. Celui de la souche « EPM » était respectivement égal à 10^7 TCID₅₀/ml et $10^{4,16}$ EID₅₀/ml sur les deux différents milieux de culture. Les suspensions virales inoculées sur cultures cellulaires primaires après leur irradiation aux rayons laser, ont eu un effet cytopathogène variable en fonction du type de rayons laser, de la puissance (2 à 10 MW) et de la durée d'exposition (2 à 10 heures). Les résultats ont montré que les rayons infrarouges (IR) laser pour une longueur d'onde de 3,39 μ m avec un diamètre du faisceau de 4 mm, une puissance de 2 MW et une durée d'exposition de plus

de 10 heures n'ont inactivé aucune des deux souches virales (souche épizootique et souche \leq EPM \leq). Par contre avec les rayons ultra-violet (UV) laser pour une longueur d'onde de $3,39 \mu\text{m}$ avec un diamètre du faisceau de 4 mm, une puissance de 10 MW et une durée d'exposition de 10 heures, on a noté une baisse des propriétés pathologiques mais le virus a gardé ses propriétés antigéniques. Ce qui se traduit par l'absence totale d'effet cytopathogène sur le tapis cellulaire ou l'absence de lésions morphologiques des œufs de poules embryonnés.

Tableau II. Contrôle de l'effet cytopathogène des échantillons viraux irradiés aux rayons ultra-violet laser, sur cultures cellulaires et sur œufs de poule embryonnés.

Contrôle des échantillons viraux irradiés	Durée d'exposition de la souche « EPM » du virus de Carré aux rayons ultraviolet laser en heures (h)									
	2	4	6	8	10	14	16	18	20	
Titre des échantillons viraux irradiés (en lg)	Sur tapis cellulaire	7,00	6,47	4,16	2,25	-	-	-	-	-
	Sur œufs de poule embryonnés	4,16	3,81	3,20	1,33	-	-	-	-	-

NB : - : absence d'effet cytopathogène sur tapis cellulaire ou sur œufs de poule embryonnés.
lg : logarithme décimal

Le développement du test sérologique

Le test d'hémagglutination pratiqué a permis de vérifier que ni les virus vivants ni les antigènes viraux irradiés n'ont donné de réaction positive d'agglutination des érythrocytes de sang humain de groupe O, ou de sang de souris, de cobaye, de bœuf, de porc ou de poule. Les anticorps les plus performants lors des tests d'immunodiffusion et de neutralisation sont ceux obtenus des lapins immunisés avec l'antigène viral inactivé et auquel on a ajouté de l'adjuvant (tableau III). Ceux-ci ont été détectables jusqu'au 45^e jour après l'immunisation.

Validation du test rapide de diagnostic de la maladie de Carré en immunodiffusion dans un gel d'agar

Le kit diagnostique rapide de la maladie de Carré mis au point, comprend l'antigène viral inactivé concentré et les anticorps polyclonaux produits dans des lapins immunisés.

En utilisant ce kit, il a été possible de tester 55 échantillons de sérum provenant de chiens présentant des signes cliniques de la maladie de Carré, à la clinique vétérinaire de la ville de Poltava. Des échantillons analysés, 52 ont présenté une réaction positive, soit 94,54 % du nombre total d'animaux malades, et 3 échantillons (soit 5,46 % des échantillons analysés) ont fourni des résultats négatifs. Après l'examen histo-pathologique des organes de ces 3 animaux (post-mortem), nous avons constaté la présence de corps de Rubarth indiquant que les chiens étaient infectés par le virus de l'hépatite et non par le virus de Carré.

Le kit développé dans cette étude, a également été utilisé pour dépister la maladie de Carré chez 416 renards d'un troupeau de la ferme de Kabilak (Ukraine). L'analyse par la réaction d'immunodiffusion en gel d'agar des 416 sérums issus des 416 renards ont donné: 201 sérums vrais positifs

sur les 202 renards cliniquement suspects (48,55 % de prévalence) ; un sérum faux négatif ; aucun faux positif ; les 214 autres sérums étaient des vrais négatifs. Dans un intervalle de confiance (IC) de 95 % la sensibilité de notre kit était égale à 99,5 %
 IC = [96,4 – 100,0] et une spécificité de 100 % IC = [97,8 - 100,0].

Tableau IIIa. Schéma d'hyperimmunisation des lapins avec différents types d'antigènes viraux de la souche «EPM».

Ordre des groupes de lapins	Nombre de lapins	Type d'antigène inoculé	Ordre des jours d'inoculation et doses	Plan d'inoculation des antigènes et dosage											
				1	7	14	21	28	35	5	10	15	20	25	30
1	4	Virus cultural inactivé et adjuvé	Jours d'inoculation doses (ml)	1	7	14	21	28	35	5	5	10	10	10	10
				5	5	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
2	4	Virus cultural vivant adjuvé	Jours d'inoculation doses (ml)	1	2	7	5	14	7	21	10	28	35		
				5	3	5	5	10	5	10	10	10	10	10	
3	4	Virus cultural inactivé	Jours d'inoculation doses (ml)	1	2	3	5	6	7	9	5	11	20		
				3	3	3	5	5	5	5	10	10	10		
4	4	Virus cultural vivant	Jours d'inoculation doses (ml)	1	2	3	5	6	7	9	5	11	20		
				3	3	3	5	5	5	5	10	10	10		
5 (témoin)	4	Suspension culturale de cellules de rein de chiot	Jours d'inoculation doses (ml)	1	3	5	6	9	5	11	20				
				3	3	5	5	10	10						

Tableau IIIb. Titre des anticorps sériques de sang de lapins par les réactions de neutralisation et d'immunodiffusion en un gel d'agar.

Sérums des groupes des lapins expérimentaux	Réaction de neutralisation	Réaction d'immunodiffusion en gel d'agar
Premier groupe	9Log2	9Log2
Deuxième groupe	7Log2	7Log2
Troisième groupe	7Log2	7Log2
Quatrième groupe	5Log2	5Log2

Log: logarithme népérien

Discussion

En 1981 seulement 1,77 % de chiens étaient affectés par la maladie de Carré à Ouagadougou, cette prévalence a atteint 17,5 % en 1990. Les résultats de notre étude ont montré que les chiens âgés de 3 à 6 mois étaient les plus affectés par la maladie de Carré : le taux de morbidité de cette tranche d'âge de chien a atteint 80 % en 1990. Ces données confirment le fait que les jeunes carnivores sont plus vulnérables que les adultes à la maladie de Carré. Alors que les petits sous allaitement de leurs mères immunisées sont rarement malades (GRACHEV *et al.*, 1989 ; TARNAGDA, 1994). Selon certains auteurs, les animaux de plus de 6 mois sont plus résistants à la maladie de Carré ; les convalescents portent des anticorps qui leur confèrent une immunité pour plusieurs années voire toute la vie (ROELKE-PARKER *et al.*, 1996). Les différentes formes cliniques de la maladie de Carré ont été observées à Ouagadougou (température oscillant entre +20 °C et +40 °C) et à Poltava (température oscillant entre +30 et -30 °C) à des proportions différentes : à Ouagadougou, la forme cutanée de la maladie de Carré (26 % des chiens malades) était 13 fois plus fréquente qu'à Poltava (1,31 %). Par ailleurs les chiens affectés par la forme pulmonaire étaient trois fois plus nombreux à Poltava qu'à Ouagadougou, 33 % et 10 % respectivement. Les résultats obtenus par APPEL *et al.* (1984) ont montré que la forme cutanée est prépondérante dans un climat chaud alors que la forme pulmonaire est plus fréquente dans un climat froid. Les résultats épidémiologiques obtenus dans nos travaux confirment ceci au Burkina Faso et en Ukraine. Les études de BLACK (1991), TARNAGDA (1994), BARRET (1999) et PASTERELET (1984) ont souligné l'importance des dégâts causés par maladie de Carré, la mise au point d'un test de diagnostic fiable et accessible est pertinente. Pour préparer les éléments d'un kit diagnostique, deux souches du virus de Carré ont été étudiées : la souche épizootique du virus de Carré isolée dans cette étude et la souche «EPM». Nous avons également constaté, selon les résultats de notre étude que les titres infectieux des deux souches virales étaient toujours plus élevés sur cultures cellulaires que sur œufs de poule embryonnés. Ces résultats corroborent ceux de SERGUEEV et SABCO (1990) qui avaient constaté que les vaccins cultureux viraux étaient meilleurs que ceux préparés sur œufs de poule embryonnés. Pendant les épreuves d'inactivation, seule la souche « EPM » a été inactivée par les rayons UV laser, la souche épizootique n'a pas pu être inactivée par les rayons UV laser même après une irradiation de plus de 20 heures. Tous les antigènes développés dans nos expériences dans un but diagnostique sont donc issus de la souche « EPM ». Une caractérisation génétique des souches sauvage et « EPM » peut être d'un apport non négligeable de la connaissance du virus de Carré à l'image des travaux de certains auteurs (JONES *et al.*, 1993) sur le virus de la peste des petits ruminants. Nos travaux ont aussi porté sur des tests d'agglutination : le virus vivant de Carré n'agglutine pas les érythrocytes d'animaux de laboratoire, ce qui concorde avec les résultats obtenus par TCHERKASKII (1971) ; les souches inactivées aux rayons UV laser n'agglutinent pas non plus les érythrocytes d'animaux de laboratoire. Par contre les sérums hyperimmuns que nous avons préparés sont très sensibles et très spécifiques dans la réaction de neutralisation et dans la réaction d'immunodiffusion en gel d'agar à des titres atteignant 9Log₂. Des chercheurs ont obtenu des sérums hyperimmuns (élément de kit diagnostique) après immunisation de lapins au virus de la peste des petits ruminants qui est de la même famille que le virus de Carré (McCULLOUGH *et al.*, 1991). Les titres élevés des sérums obtenus (9Log₂) dans nos schémas d'immunisation des lapins, sont dus à l'efficacité de la méthode physique d'inactivation dont l'irradiation aux rayons UV laser (OKIGAKI, 1972 ; MITCHEL, 1984 ; Serieh, 1984) et à l'effet

stimulateur de l'adjuvant utilisé. Les sérums hyperimmuns spécifiques préparés dans la présente étude, ont été utilisés dans la réaction d'immunodiffusion en gel d'agar pour confirmer le diagnostic de la maladie de Carré chez des chiens malades à Poltava en Ukraine. Des 55 échantillons de sérum issus de prélèvements sanguins de chiens cliniquement affectés par la maladie de Carré, 52 échantillons ont été confirmés positifs par la réaction d'immunodiffusion. La sensibilité de 99,5 % et la spécificité de 100,0 % obtenues en évaluant le kit diagnostique mis au point ouvrent des perspectives intéressantes pour le perfectionnement dudit kit.

Remerciements

Nous remercions le Ministère de l'Enseignement Supérieur de l'Ukraine et les laboratoires qui ont fourni notamment les réactifs et les antigènes.

Références citées

- AFANACEV P.E., LOGVINOV G.G., 1991.** Le service vétérinaire militaire de la Direction Centrale des Forces armées Frontalières du KGB de l'URSS ; les maladies virales du chien. *Vétérinaria*, 5; 64-67.
- APPEL M.J., ROBSON D.S., 1973.** A microneutralization test for canine distemper virus. *Amer. J. Veterin.*, 34 (11): 1459-1463.
- APPEL M. J. G., SHEK W. R., SHESHBERADARAN H., NORRBY E., 1984.** Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch. Virol.*, 82, 73-82.
- APATENKO V.M., 1991.** Les maladies virales les plus dangereuses des animaux. Ourajaï, Kiev, Ukraine, 144 p.
- BAMGARTNER W., ALLDINGER S., BEINEKE A., GROTERS S., HERDEN C., KAIM U., MULLER G., SEELIGER F., VAN MOLL P., WOHLSEIN P., 2003.** Canine distemper, an agent looking for news hosts. *Dtsch Tierarztl Wchenschr.*, 110 (4): 137-42.
- BARRET T., 1999.** Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol.* 1; 69 (1-2): 3-13.
- BENJAMIN C. DAMIEN, BYRON E. E. MARTINA, SERGE LOSCH, JOEL MSSONG, ALBERT D. M. E. OSTERHAUS, AND CLAUDE MULLER. 2002.** Prevalence of Antibodies against canine Distemper Virus among Red Foxes in Luxembourg *Journal of Wildlife diseases*, 38: 856-859.
- BLACK F. L., 1991.** Epidemiology of paramyxoviridae. In: «The paramyxoviruses».
- CARRE H., 1905.** Sur la maladie des jeunes chiens. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 140: 689-690, 1489-1491.
- HEWICKER, M., S. DAMSCH. AND G. TRAUTWEIN. 1990.** Detection of canine distemper viral antigen in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue of a fitch, using an immunoperoxidase technique. *Deutsche Tierärztliche wochenschrift* 97: 85-88.
- GRACHEV M. A., KUMAREV V. P., MAMAEV L. V., ZORIN V. L., BARANOVA L. V., DENIKINA N. N., BELIKOV S.I., PETROV S. I., PTROV E. A., 1989.** Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, 338, 209.
- JONES L., GIAVEDONI L., SALIKI J. T., BROWN C., MEBUS C., YILMA T., 1993.** Protection of goats against peste des petits ruminants with a vaccinia virus double recombinant expressing the F and H genes of rinderpest virus. *Vaccine*, 11 (9):961-964.
- KARICHEVA A.F., SOURIN V.N., 1980.** Guide pratique de virologie, Chitintse, Kichinev, Moldavie, 210 p.
- KINGBURY D.** Plenum Pres, New York, p. 509-536
- LOPEZ-PENA, M., M. I. QUIROGA, S. VAZQUEZ, AND J. M. NIETO. 1994.** Detection of canine distemper viral antigen in foxes in north-western Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 30:95-98.

- McCULLOUGH K. C., OBI T U., SHESHBERADARAN H., 1991.** Identification of epitopes on the inter viron proteins of rinderpest virus which are absent from peste des petits ruminants virus. *Vet Microbiol.*, 26 (4): 313-21.
- MITCHEL S., Mc CERMICK J., 1984.** Physico-chemical inactivation of Lassa, Ebola and Malburg viruses and effect of the laboratory analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 20 (3): 486-489.
- OKIGAKI T., ROUNDS D. E., CHAMBERLAIN E., 1972.** Laser radiation of tissue cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 122 (2): 713-727.
- OUCHTERLONY O., 1953. Antigen-antibodies reactions in gels, types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Pathol. et Microbiol., Scand.*, 32(3) : 231-240.
- PASTERELET P. P., 1984.** Les infections digestives d'origine virale chez le chien, *Ann. Med., Paris*, 128 (6) : 473-483.
- ROELKE-PARKER M.E., MUNSON L., PACKER C., KOCK R., CLEAVELAND S., CARPENTER M., 1996.** A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379, 441-445.
- SERIEH M.N., 1984.** Quelques conclusions sur l'irradiation aux rayons laser sur les échanges cellulaires chez les animaux et les micro-organismes. *Collection université de Kouïbychev*, 32 : 104-110.
- SOURIN V.N., BELAOUSSOVA R.V., 1991.** Le diagnostic des maladies virales des animaux. *Kolos, Moscou*, 527 p.
- TARNAGDA Z., 1990.** La rage au Burkina Faso. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire de l'institut Frounze de Kichinev, Moldavie, 50p.
- TARNAGDA Z., 1994.** Diagnostic de la peste canine par la réaction d'immunodiffusion en gélose. Thèse de doctorat Ph.D en microbiologie, virologie et immunologie, Institut Expérimental de Kharkov, Ukraine, 151p.
- TCHERKASKII E.S., 1971.** La peste canine. Edition Médecine, Moscou, URSS, 171 p. 5