

COMMUNICATIONS

Vaccination du renard contre la rage par voie orale

Bilan des essais réalisés en France

par J. BLANCOU *, L. ANDRAL *, M. F. A. AUBERT *
et M. ARTOIS *

avec la collaboration technique de Jacqueline et J. P. GEORGE,
Marie José BARRAT, Eveline CAIN, Myriam SELVE

SUMMARY

ORAL VACCINATION OF FOXES AGAINST RABIES RESULTS OF TRIALS IN FRANCE

Trials of oral vaccination against rabies are reported in 117 red foxes (*Vulpes vulpes*), their results being evaluated by titration of antibodies and challenge with a wild strain. These trials used six different strains of rabies virus (Flury, S.A.D., C.V.S., G.S./C., Ts O 55 and Av O 1) living, modified by serial passages *in vivo* or *in vitro*, and one inactivated C.V.S. strain. This last did not protect foxes after direct deposit in their mouth, but living virus did, provided they were used at sufficient titres.

However safety test of these virus, for non target species, remain to be achieved before their practical use in the field.

Key words

Rabies - Fox - Vaccination - Oral route.

* Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Centre National d'Etudes sur la Rage, B.P. 9, 54220 Malzéville.

RÉSUMÉ

Les essais de vaccination par voie orale contre la rage de 117 renards roux (*Vulpes vulpes*) sont rapportés, leurs résultats étant jugés par le titrage des anticorps neutralisants suivis de l'épreuve virulente par une souche sauvage. Ces essais ont employé six souches différentes de virus rabique (Flury, « S.A.D. », « C.V.S. », « G.S./C », « Ts O 55 » et « Av O1 » non inactivées, modifiées par passages *in vivo* ou *in vitro*, et une souche de virus C.V.S. inactivée. Si cette dernière n'a entraîné aucune protection après dépôt direct dans la gueule des renards, d'autres se sont avérées capables d'immuniser le renard à condition d'être employées à un titre suffisant.

L'étude complète de l'innocuité de ces virus, pour les espèces « non cibles », reste toutefois un préalable indispensable à leur emploi pratique.

Mots clés

Rage - Renard - Vaccination - Voie orale.

INTRODUCTION

L'immunisation du renard par distribution d'appâts contenant un vaccin antirabique a souvent semblé une alternative séduisante à l'actuelle prophylaxie sanitaire contre la rage chez cette espèce.

En France, dès 1968, les Services Vétérinaires Français ou d'autres organismes de recherches associés se sont intéressés à cette méthode, tout en restant conscients du très grand nombre de préalables (scientifiques, techniques, financiers) à résoudre avant d'envisager une application pratique sur le terrain (1).

Le but de cette note est de dresser un bilan des résultats obtenus à ce jour, dont une partie seulement a été antérieurement publiée, puis de les comparer à ceux obtenus précédemment ou simultanément par les centres de recherches étrangers travaillant sur le même sujet.

Avant d'exposer ces résultats nous rappellerons le principe technique de la vaccination par voie orale, le matériel et les méthodes utilisées pour la mener à bien.

PRINCIPE DE LA VACCINATION ANTIRABIQUE PAR VOIE ORALE

Les premiers essais de vaccination par voie orale du renard ont été entrepris aux Etats-Unis [4, 5, 10, 21] et au Canada [6] à la suite d'observations de contamination par voie orale qui démontraient la possibilité, pour le virus rabique non inactivé, de franchir la muqueuse buccale. Ces essais furent repris et confirmés dans plusieurs pays en particulier en Allemagne [12, 15], en Suisse [18] et en France [3, 11] au cours de nombreux essais d'efficacité et d'innocuité dont les résultats ont été revus en 1976 [20] et 1979 [7].

Dans la plupart de ces essais le principe de la vaccination était d'exploiter la capacité d'un virus-vaccin modifié à pénétrer la *muqueuse buccale*, où il était déposé, soit directement soit à la faveur de l'ingestion de divers appâts auxquels il était associé (en paillette ou sachet plastique).

Dans d'autres essais plus récents le virus (inactivé ou non) a été amené au contact de la *muqueuse duodénale*, après lui avoir fait franchir la barrière stomacale en gélules ou pilules « entérisées » c'est-à-dire protégées contre le pH réduit de l'estomac et délitées au pH plus élevé de l'intestin [3, 14, 17²].

L'absorption du virus rabique non inactivé au niveau de ces muqueuses a entraîné une élaboration d'anticorps circulants (Ig G) et une résistance à l'épreuve ultérieure par un virus sauvage.

MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL

La plupart des expériences ont été réalisées à Nancy * sur *renards* avec *divers types de vaccins*, l'épreuve des animaux vaccinés étant réalisée avec un *virus sauvage*.

1. *Les renards*

Les 117 renards roux (*Vulpes vulpes*) utilisés étaient âgés de 1 à 2 ans, obtenus par déterrage en zone indemne de rage et élevés dans les conditions précédemment décrites [11].

2. *Les divers types de vaccins*

• La plupart des essais ont été réalisés avec des *virus-vaccins modifiés* (non inactivés) dont les caractéristiques ont été décrites antérieurement [7] et sont, en bref, les suivantes :

— *Souche S.A.D.* : la souche S.A.D. (« Street Alabama Dufferin ») d'origine canine a été modifiée par des passages nombreux et variés *in vivo* et *in vitro*. Celle utilisée dans les essais était cultivée sur cellules rénales de chien.

— *Souche Flury* : cette souche a été isolée d'un cas de rage humaine (Miss Flury) et modifiée par culture *in ovo* puis *in vitro*. C'est la souche H.E.P. (High Egg Passage) qui a été utilisée dans nos essais.

* Les autres expériences réalisées en France par G. BIJLENGA (17²) que l'auteur souhaite publier personnellement, de même que les essais sur espèces non cibles : souris (2), rat ou chats (16) ne sont pas rapportés ici.

— *Souche GS/C* (Glandes Salivaires/Cellules) a été obtenue par adaptation directe d'une souche sauvage isolée d'un renard de l'Est de la France, sur cellules BHK 21 puis CER [7].

— *Souche C.V.S.* (Challenge Virus Standard) dérivée de la souche isolée par PASTEUR en 1882 d'un bovin enrégé.

— *Souche ts O 55* (thermo-sensible 55) a été obtenue par mutation de la souche parentale C.V.S. et sélection par clonage pour le caractère thermosensibilité [2].

— *Souche Av O1* (Avirulente Orsay 1) a été obtenue par culture de la souche C.V.S. en présence d'anticorps monoclonaux dirigés contre un déterminant glycoprotéique du virus [9].

• Dans deux cas seulement [3] le virus employé était *un virus modifié inactivé* par la Bétapropiolactone.

3. Les souches d'épreuve

Les épreuves réalisées à Nancy sur 117 sujets ont employé une suspension de glandes salivaires de renard enrégé dont la dose inoculée était calculée en « doses létales 50 p.100 intracérébrale/souris » (= DL 50/i.c./souris), une dose létale 50 p.100 intramusculaire renard étant égale à environ 0,3 DL 50/i.c./souris [8].

MÉTHODES

Les méthodes de vaccination et de contrôle de l'immunité post-vaccinale sont les suivantes :

1. Vaccination

Deux méthodes différentes ont été employées dans les essais de vaccination par voie orale réalisés sur renards, selon que le vaccin contenait un virus inactivé ou non.

— Essai avec des virus modifiés non inactivés

Dans tous les essais le virus, après titrage préalable, est déposé directement sur la langue à l'aide d'une pipette ou d'un embout de seringue, sans léser la muqueuse, sous le volume de 1 à 2 ml.

Remarque : Dans d'autres cas le virus est placé dans un sachet de plastique ou de latex, lui-même introduit sous la peau d'une tête de poule de façon à pouvoir se rompre et libérer le vaccin dès que l'appât est mordu. La quantité exacte de virus venue ainsi au contact de la muqueuse étant, dans ce cas, inconnue nous n'en rapporterons pas ici les résultats.

— *Essai avec un virus inactivé*

Dans trois cas [3, 16, 19] le virus inactivé a été employé après introduction en gélules entérisées.

2. *Contrôle de l'immunité post-vaccinale*

L'immunité post-vaccinale a été contrôlée de deux façons : par la mesure de titre d'anticorps sériques, et par l'épreuve virulente.

— *Mesure du titre d'anticorps*

Les renards ont subi une prise de sang à des temps variables après la vaccination, et le titre d'anticorps neutralisants de leur sérum déterminé par la technique de séroneutralisation sur souris [13].

— *Epreuve virulente*

Les renards vaccinés ainsi qu'un nombre approprié de renards témoins, sont éprouvés par inoculation dans le muscle temporal de 1 000 à 3 000 DL 50/i.c./souris d'une souche sauvage d'origine vulpine (voir matériel).

RESULTATS

De façon à pouvoir comparer simultanément les résultats d'essais souvent réalisés à plusieurs années d'intervalle nous les avons regroupé en un seul tableau ci-contre où figurent :

- le type de vaccin et la souche vaccinale utilisés ;
- le titre ou la valeur antigénique de ces vaccins, par dose ;
- le titre d'anticorps post-vaccinal ;
- les conditions de l'épreuve virulente ;
- le résultat de cette épreuve.

L'examen de ce tableau montre que :

1. *En ce qui concerne le vaccin à virus inactivé*

L'essai réalisé par administration de 20 puis 17 unités internationales à 15 jours d'intervalle n'a entraîné ni production d'anticorps neutralisants ni résistance à l'épreuve chez les cinq renards utilisés. Ceci ne confirme donc pas les résultats obtenus chez le chat [16, 19] et espérés chez le renard [14].

2. *En ce qui concerne les vaccins à virus modifiés, non inactivés*

Il se confirme que la résistance à l'épreuve est très nettement liée à la dose de virus-vaccin ingérée, aussi bien pour la souche Flury H.E.P. [11] que pour les autres. Certaines souches n'entraînent donc

TYPE DE VACCIN	SOUCHÉ VIRALE	QUANTITÉ DE VIRUS (OU D'ANTIGÈNE) INOCULÉ	TITRE EN ANTICORPS quelques jours avant l'épreuve (Séronéutralisation sur souris)	ÉPREUVE PAR INOCULATION I.M. DU VIRUS SAUVAGE G.S.		MORTALITÉ CONSÉCUTIVE après observation de 90 à 105 jours		RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE		
				Délai*	Inoculum**	vaccinés	témoins			
V.V.I.	C.V.S.	20 puis 17 unités internationales	Néant	91	10 ^{3,5} DL 50	5/5	2/2	3		
	S.A.D.	10 ^{3,2} DL 50	4 sujets avec anticorps (\bar{x} = 2,34 U.I./ml)	105	10 ^{2,95} à 10 ^{3,3} DL 50	1/5	5/5	11		
	Flury H.E.P.	6 × 10 ⁷ U.F.P. (= 10 ^{4,7} DL 50)	5 sujets avec anticorps (\bar{x} = 0,5 U.I./ml)	94	id.	4/10	5/5	11		
6 × 10 ⁶ U.F.P. (= 10 ^{4,9} DL 50)		2 sujets avec anticorps (\bar{x} = 0,5 U.I./ml)	94	id.	8/10					
6 × 10 ⁵ U.F.P. (= 10 ^{5,9} DL 50)		Néant	94	id.	9/10					
V.V.M.	G.S.C.	10 ³ DL 50	Néant	40	10 ³ DL 50	5/5	5/5	résult. origin.		
		10 ³ DL 50	2 sujets avec anticorps (\bar{x} = 6,7 U.I./ml)	40	id.	3/5				
		10 ³ DL 50	Néant	85	10 ^{3,4} DL 50	5/5	5/5			
		10 ^{3,2} DL 50	2 sujets avec anticorps (\bar{x} = 0,35 U.I./ml)	85	id.	2/5				
		10 ^{7,2} DL 50	3 sujets avec anticorps (\bar{x} = 20,1 U.I./ml)	90	10 ^{3,5} DL 50	3/6				
		10 ^{7,1} DL 50	2 sujets avec anticorps (\bar{x} = 2,15 U.I./ml)	90	10 ^{3,7} DL 50	0/2	5/5			
		C.V.S.	10 ^{3,4} DL 50	Néant	45	10 ^{3,7} DL 50	5/5		4/4	résult. origin.
		ts O 55	10 ⁴ DL 50	Néant	45	10 ^{3,7} DL 50	5/5			résult. origin.
Av O 1	10 ⁷ U.F.P.	2 sujets avec anticorps (\bar{x} = 0,35 U.I./ml)	45	10 ³ DL 50	3/5	3/3	résult. origin.			

V.V.M. : vaccins à virus modifié (« vivant »). — V.V.I. : vaccins à virus inactivé.

Tous ces résultats concernent des virus administrés dans les mêmes conditions c'est-à-dire dépôt direct, dans la gueule, de 1 ml d'inoculum. Tous les renards témoins inoculés simultanément en nombre généralement égal aux sujets vaccinés sont morts après l'épreuve.

* Délai : nombre de jours après l'ingestion du virus.

** DL 50 (= DL 50/ic/souris/0,03 ml) ou U.F.P. (Unités formant plages).

qu'une résistance faible ou nulle lorsqu'elles sont administrées à un titre trop bas (exemple : C.V.S., GS/C, ts O 55) ce qui ne préjuge pas de leur capacité d'induire une protection dans d'autres conditions. La comparaison de la valeur intrinsèque des souches est donc difficile puisqu'il est naturellement impossible de les utiliser exactement à la même dose, et d'autant plus que la mesure de cette dose ne peut pas toujours être faite avec la même unité (DL 50 souris ou U.F.P.). Néanmoins il n'apparaît pas de différence significative dans la protection conférée par les souches utilisées à des doses suffisantes (10^5 DL 50 ou 10^7 U.F.P.), c'est-à-dire entre les souches S.A.D., Flury H.E.P., GS/C et Av O1.

Seuls des essais complémentaires sur un plus grand nombre de renards, et les épreuves d'innocuité de ces différentes souches, pourraient permettre de les départager ultérieurement.

CONCLUSION - DISCUSSION

La vaccination par voie orale du renard est donc, d'après les essais menés en France, réalisable avec au moins cinq souches de virus rabique modifiée à condition que ce virus soit administré à une dose suffisante et déposé directement dans la gueule de l'animal.

Des essais complémentaires faits à Nancy et non représentés au tableau général ont montré par ailleurs que, lorsque le virus n'était pas déposé directement dans la gueule mais introduit dans un sac plastique associé à l'appât son efficacité était beaucoup plus réduite (exemple : 1 renard sur 10 protégés par cette méthode, contre 3 sur 5, à dose de virus GS/C égale, lorsque le vaccin est déposé directement dans la gueule).

De nombreux essais restent donc à entreprendre, avec l'une ou l'autre de ces souches, avant de quantifier avec certitude le nombre de sujets qu'il est possible d'*immuniser avec les appâts* contenant le vaccin. En effet si les travaux effectués à l'étranger par d'autres auteurs ont bien été confirmés par les essais réalisés en France en ce qui concerne l'activité du virus modifié administré par dépôt direct dans la gueule, les résultats rapportés par ces mêmes auteurs seraient meilleurs que ceux obtenus en France en ce qui concerne l'activité après incorporation en appât. Ainsi 29 renards sur 58 ont été protégés à l'étranger avec la souche S.A.D. [12, 17, 18] contre l'épreuve virulente, et aucun dans nos essais faits en France [11].

Outre ces essais d'autres, beaucoup plus importants, devraient être simultanément entrepris pour *vérifier l'innocuité* des souches vaccinales choisies car plusieurs expérimentations ont déjà signalé une persistance de la virulence pour certaines espèces sauvages « non cibles » [7, 17¹ s 4].

C'est donc ce dernier point, dont l'importance est accrue par l'incertitude de règle en matière de stabilité génétique de virus vaccin « vivant », qui reste le préalable indispensable à toutes tentatives de prophylaxie médicale, sur le terrain, de la rage du renard sauvage.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur P. ATANASIU (Institut Pasteur, Paris) ainsi que Mme Anne FLAMAND et Mlle Françoise BUSSEREAU (Laboratoire de Génétique, Université de Paris Sud) de nous avoir fourni les souches Flury, S.A.D., GS/C, ts O 55 et Av O 1 utilisées dans les essais faits à Nancy, ainsi que le Docteur BÖGEL de nous avoir autorisé à citer les communications faites à l'Organisation Mondiale de la Santé.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRAL (L.). — La rage. Epidémiologie. Prophylaxie. Sera-t-il possible de sortir de l'impasse? *Bull. Acad. Vét.*, 1968, 41, 225-226.
- [2] AUBERT (M. F. A.), BUSSEREAU (F.) and BLANCOU (J.). — Pathogenic, immunogenic and protective powers of ten temperature-sensitive mutants of rabies virus in mice. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 1980, 131 E, 217-228.
- [3] AUBERT (M. F. A.), BLANCOU (J.) and HOFFMAN (M.). — Oral vaccination of foxes against rabies: trials with inactivated virus in enteric coated tablets. *Rab. Inf. Exch.*, 1981, 5, 37-38.
- [4] BAER (G. M.), ABELSETH (M. K.) and DEBBIE (J. G.). — Oral vaccination of foxes against rabies. *Am. J. Epidemiol.*, 1971, 93, 487-490.
- [5] BAER (G. M.). — The natural history of rabies. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975, 2, 261-266.
- [6] BLACK (J. G.) and LAWSON (K. F.). — Further studies of sylvatic rabies in the fox (*Vulpes vulpes*). Vaccination by the oral route. *Can. Vet. J.*, 1973, 14, 206-211.
- [7] BLANCOU (J.). — Prophylaxie médicale de la rage. *Rec. Méd. Vét.*, 1979, 55 (9), 733-741.
- [8] BLANCOU (J.), AUBERT (M. F. A.), ANDRAL (L.) et ARTOIS (M.). — Rage expérimentale du renard roux (*Vulpes vulpes*). 1. Sensibilité selon la voie d'infection et la dose infectante. *Rev. Méd. Vét.*, 1979, 130 (7), 1001-1015.
- [9] COULON (P.), ROLLIN (P.), BLANCOU (J.) and FLAMAND (A.). — Avirulent mutants of the C.V.S. strain of rabies virus. *Comp. Immun. Microb. Inf. Dis.*, 1982, 5, n° 1-3, p. 117-122.
- [10] DEBBIE (J. G.), ABELSETH (M. K.) and BAER (G. M.). — The use of commercially available vaccines for the oral vaccination of foxes against rabies. *Am. J. Epidemiol.*, 1972, 96, 231-235.
- [11] DUBREUIL (M.), ANDRAL (L.), AUBERT (M. F. A.) and BLANCOU (J.). — The oral vaccination of foxes against rabies. An experimental study. *Ann. Rech. Vet.*, 1979, 10 (1), 9-21.
- [12] FROST (J. W.) and KIEFERT (C.). — Zur oralen Immunisierung des Fuchses gegen Tollwut. *Z. Säugetierk.*, 1979, 44, 52-55.
- [13] KAPLAN (M. M.) et KOPROWSKI (H.). — La rage. Techniques de laboratoire, 3^e éd. Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 1974.

-
- [14] LAWSON (K. F.), JOHNSTON (D. H.), PATTERSON (J. M.) and RHODES (A. J.). — Studies on the immunization of wildlife against rabies. Fifth Int. Congr. Virol., Strasbourg, 1981, P 12/05.
- [15] MAYR (A.), KRAFT (H.), JAEGER (O.) and HAACKE (H.). — Orale Immunisierung von Füchsen gegen Tollwut. *Zbl. Vet. Med.*, 1972, 19, 615-625.
- [16] METIANU (T.). — Vaccination antirabique par voie orale avec des vaccins tués. Premiers résultats. *Bull. Acad. Vét. France*, 1981, 54 (4), 481-490.
- [17] Organisation Mondiale de la Santé :
1. Report on consultation on oral immunization of wild living foxes against rabies, Frankfurt, 1972.
 2. Report on consultation on oral vaccination of foxes against rabies, Nancy, 1977, Doc. VPH/78.7.
 3. Report on consultation on rabies prevention and control, Lyon, 1980, Doc. WHO/RAB/RES 80.8 et 80.188.
 4. Joint C.N.E.R.-W.H.O. Scientific Meeting on animal rabies, Nancy, 1981, Doc. WHO/RAB/RES 81.13 et 81.190.
- [18] STECK (F.), HAFLIGER (U.), STOCKER (C.) and WANDELER (A.). — Oral immunization of foxes against rabies. *Experimentia*, 1978, 34, 1662.
- [19] SUREAU (P.), BOLANOS (A.), METIANU (T.) and ATANASIU (P.). — Experimental rabies vaccination by oral route with inactivated cell culture vaccine. Fifth Int. Congr. Virol., Strasbourg, 1981, P 12/09.
- [20] WACHENDORFER (G.). — Gegenwärtiger Stand der Vakzination von Füchsen gegen Tollwut. *Prakt. Tierarzt*, 1976, 57, 801-808.
- [21] WINKLER (W. G.) and BAER (G. M.). — Oral rabies immunization of red foxes (*Vulpes fulva*) with vaccines in sausage baits. *Am. J. Epidemiol.*, 1976, 103, 408-415.
-