P7904

## EXCRETION DU VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY PAR LES VOIES GENITALES MALES DU PORC. PERSISTANCE DU VIRUS DANS LA SEMENCE DE VERRAT

P. VANNIER (I), B. GUEGUEN (2) (\*)

(1) Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Station de Pathologie Porcine B.P. 9, 22440 PLoufragan

(2) Institut Technique du Porc - M.N.E., 149, rue de Bercy, 75579 Paris Cedex

Après l'infection initiale, les Herpès virus, auxquels se rattache le virus de la maladie d'Aujeszky, persistent parfois très longtemps chez leur hôte sous la forme d'une infection latente qui a été démontrée pour la plupart des espèces, qu'elles soient contaminées expérimentalement ou naturellement par ces virus. Le cobaye est fréquemment utilisé comme modèle d'étude du portage latent et des infections recurrentes dans le cas du virus Herpès simplex humain [4]. Chez l'homme, plusieurs sites, dans lesquels ce virus se maintient à l'état latent, ont été identifiés : l'œil, la cavité buccale, le système nerveux constituent autant de foyers d'infection latente dans lesquels les virus Herpès peuvent persister plusieurs mois voire plusieurs années [1]. A l'issue de cette longue période durant laquelle l'infection virale ne se traduit par aucune manifestation clinique, le pouvoir pathogène du virus peut se manifester à nouveau et entraîner l'apparition des lésions caractéristiques. Les porcs infectés par le virus de la maladie d'Aujeszky demeurent pendant plusieurs mois des vecteurs biologiques responsables de la contamination d'animaux sains [2]. Grâce à l'utilisation de certaines techniques d'isolement, le virus de la maladie d'Aujeszky a été retrouvé dans les amygdales, les ganglions lymphatiques, la muqueuse nasale de porcs infectés depuis plus de 170 jours [3].

Les voies génitales constituent un site de persistance des Herpès virus chez l'homme et de nombreuses espèces animales réceptives [1, 5]., Il nous a semblé intéressant de préciser la durée d'excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky par les voies génitales de verrats préalablement infectés par voie préputiale. Pour compléter cette première étude, nous avons également recherché un éventuel effet virulicide de la semence de verrat sur le virus de la maladie d'Aujeszky.

## I . MATERIEL ET METHODES

- 1 · Etude de l'excrétion du virus par les voies génitales
- a infection des verrats

Trois verrats ont été inoculés par voie préputiale avec 5 ml d'une suspension de virus de la maladie d'Aujeszky titrant 10<sup>6,5</sup> DCP<sub>50</sub>/ml : La suspension virale est injectée dans le prépuce à l'aide d'une sonde montée sur une seringue. Après injection, on procède à un massage du prépuce dont on ferme l'orifice.

#### b · prélèvements

#### - sang:

Une prise de sang est effectuée toutes les semaines, la première étant réalisée trois jours après l'infection expérimentale.

## - lavages préputiaux :

Afin de rechercher chaque semaine le virus dans les liquides de lavages préputiaux, 20 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) stériles sont injectés à l'aide d'une sonde montée sur une seringue (matériel stérilisé à l'autoclave) au niveau de la poche préputiale du verrat. Après un massage de quelques secondes le liquide est recueilli dans un flacon stérile.

## · sperme:

La semence d'un seul verrat sur les trois a pu être collectée régulièrement toutes les semaines; celle des deux autres verrats n'a été récoltée qu'une seule fois.

Les prélèvements de semence et de lavages préputiaux ont été poursuivis pendant 77 jours.

(\*) Avec la collaboration technique de P. SALZE, R. CARIOLET, J.P. DELALANDE et B. BEAUREPAIRE

#### c · traitement des prélèvements

#### sérums :

Après coagulation du sang, le sérum est centrifugé puis conservé à — 20°C. La recherche des anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky par microméthode est effectuée à virus constant et sérum variable. Le titre en anticorps est exprimé par la valeur de la dernière dilution du sérum neutralisant 100 DCP<sub>50</sub>/ 0,05 ml.

#### - lavage préputial et sperme :

 Une partie de ces prélèvements est d'abord utilisée pour la recherche du virus de la maladie d'Aujeszky. Après récolte, ces prélèvements sont conservés à — 20 °C. Chaque prélèvement subit deux cycles de congélation-décongélation afin de libérer le maximum de particules virales dans le liquide extra cellulaire. La suspension est alors centrifugée à 2000 tours/mn pendant 5 minutes.

Des expériences préliminaires réalisées en mélangeant une suspension virale de titre connu et la semence ont permis de constater qu'une dilution de la semence au 1/2 était suffisante pour éliminer tout effet toxique de celle-ci sur les cellules PK 15. Par contre, le liquide préputial doit être dilué au 1/4 pour obtenir le même résultat. Après dilution dans du milieu MEM (Minimum Eagle Medium\*) contenant des antibiotiques et un antifongique, 0,2 ml de la suspension est inoculé sur un tapis cellulaire (lignée PK 15) âgé de 24 heures. Après adsorption, les tapis sont rincés deux fois et du milieu d'entretien est alors ajouté dans chaque tube.

Les tapis sont observés quotidiennement pendant 8 jours. Si des lésions sont remarquées, le tube est congelé et un deuxième passage est réalisé dans les mêmes conditions afin de confirmer la présence d'un effet cytopathogène spécifique. En l'absence de toute lésion, le tube est congelé au bout de 8 jours et trois passages sont effectués sur cellules PK 15. Au premier isolement d'un virus de la maladie d'Aujeszky, la nature du virus a été vérifiée par immunofluorescence avec un sérum monospécifique marqué à l'isothiocyanate de fluoresceine.

• Une deuxième partie des prélèvements est utilisée pour la recherche des anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky. Les prélèvements sont conservés à — 20°C, puis ils sont décongelés, centrifugés et chauffés à 56° pendant 30 minutes. La recherche des anticorps est effectuée de manière analogue à la séro-neutralisation décrite précédemment.

#### - organès prélevés lors des abattages :

- Après la sacrification des verrats, les vésicules séminales, une fraction des testicules, de l'epididyme, la prostate et une partie de la muqueuse préputiale sont prélevées et congelées à 20°C. Le virus de la maladie d'Aujeszky est recherché en broyant les organes dans du PBS à la concentration de 10%. La suspension est centrifugée et inoculée sur cellules PK 15 dans des conditions identiques aux liquides de lavages préputiaux et aux prélèvements de semence.
- Des fragments de testicule et de muqueuse préputiale sont finement découpés et mis en culture, selon la technique de SABO et RAJCANI [3] dans du milieu MEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal. Le milieu est changé tous les cinq jours. Le virus est recherché dans le liquide récolté au moment du changement de milieu.

# 2 - Recherches d'un effet virulicide de la semence de verrat sur le virus de la maladie d'Aujeszky :

0,1 ml d'une suspension virale titrant 10<sup>6</sup> DCP<sub>50</sub>/ML est mis en contact pendant 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 6 heures, 24 heures, 48 heures et 5 jours avec 0,5 ml d'une semence de verrat provenant d'un centre d'insémination artificielle. Ce contact est effectué à deux températures différentes (37 °C et 25 °C). A l'issue du temps de contact, le mélange est congelé. Il est alors inoculé sur cellules PK 15. Tous les tapis cellulaires inoculés avec les différents mélanges sont congelés au même stade d'apparition de l'effet cytopathogène. L'inoculation sur cellules s'avère nécessaire car le titrage direct du mélange virus-sperme était rendu impossible par son caractère toxique pour les cellules. En effet, en titrant directement sur microplaque, le mélange virus-sperme reste en permanence au contact des cellules gênant ou inhibant leur croissance. Afin de comparer l'évolution du titre du virus mis en contact avec le sperme de verrat avec un témoin, 0,1 ml de la même suspension virale subit un traitement analogue, mais est dilué dans 0,5 ml de mitieu MEM. La suspension est également inoculée sur cellules PK 15 puis congelée dès l'apparition de l'effet cytopathogène. Après décongélation et centrifugation les surna-

geants des cellules inoculées avec le mélange virus plus sperme et les suspensions témoins sont titrés. L'artifice consistant à inoculer sur cellules le mélange et les suspensions témoins peut modifier les titres initiaux qui évoluent cependant dans le même sens et en augmentant par rapport à la suspension d'origine.

Une autre fraction de l'échantillon de semence est inoculée sur cellules PK 15 afin de vérifier l'absence de toute contamination virale.

#### II - RESULTATS:

## 1 - Etude de l'excrétion du virus par les voies génitales :

### a - étude sérologique :

8 jours après l'infection, des anticorps neutralisants sont décelés dans le sérum de deux verrats et seulement a partir du 15° jour dans le sérum du 3° verrat. Les titres maxima sont atteints 29 jours après l'inoculation (tableau 1).

TABLEAU 1

ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE D'ANTICORPS NEUTRALISANTS

DANS LE SÉRUM DES VERRATS INFECTÉS PAR VOIE PRÉPUTIALE

NOM OU NUMERO DU VERRAT	13	18	J 15	J 22	J 29
Lipide		1/2	1/8	1/64	1/128
1815	_	1/2	1/16	1/64	1/128
1844			1/16	1/64	1/64

Jx : Jour après l'inoculation expérimentale

1/2 : valeur de la dernière dilution de sérum neutralisant 100 DCP 50/0,05 ml.

## b · recherches du virus dans les liquides de lavages préputiaux et dans le sperme :

Le virus de la maladie d'Aujeszky a été isolé dans tous les liquides préputiaux récoltés sur deux verrats jusqu'au 10° jour après l'inoculation. Chez l'un des verrats le virus n'est retrouvé dans le liquide de lavage préput'al qu'au 3° jour après l'infection. Après le 3° et le 10° jour, aucun virus n'a pu être isolé jusqu'au terme de l'expérimentation. Les virus isolés le 3° et le 10° jour après l'inoculation ont été titrés en microplaque; le titre du virus augmente d'une unité logarithmique entre ces deux prélèvements (tableau2).

TABLEAU 2

RÉSULTATS DE LA RECHERCHE DU VIRUS DANS LE LIQUIDE PRÉPUTIAL

DES VERRATS INFECTÉS PAR VOIE PRÉPUTIALE

NOM OU NUMERO DU VERRAT	J 3	J 10	J 14	J 18		J 71
Lipide	+ Titre 10 <sup>3,7</sup> DCP 50/ml	+ Titre 10 <sup>4,7</sup> DCP 50/ml	_		-	_
1815	+	+	-	_	ND	ND
1844	+	_	_	_	ND	ND

ND: Non Déterminé

Jx : Jour après l'inoculation

Des résultats comparables sont obtenus à partir des prélèvements de semence. Le virus est retrouvé dans les échantillons prélevés 3 et 8 jours après l'inoculation du verrat « Lipide ». Il n'est pas retrouvé au-delà de la première semaine qui a suivi cette infection expérimentale. Dans les prélèvements effectués sur les deux autres verrats, le virus n'est retrouvé que le 3° jour après l'infection; cependant aucun échantillon de sperme n'a pu être obtenu le 8° jour après l'inoculation pour les deux verrats (1815-1844) et le 11° jour pour le verrat 1844.

Dans les échantillons de sperme prélevés sur le verrat Lipide, le titre du virus augmente de plus d'une unité logarithmique entre le 3° et le 8° jour (tableau 3).

TABLEAU 3

RÉSULTATS DE LA RECHERCHE DE VIRUS DANS LE SPERME DE VERRATS

INFECTÉS PAR VOIE PRÉPUTIALE

NOM OU NUMERO DU VERRAT	13	J 8	J 11	J 15		J 77
Lipide	+ Titre 10 <sup>3,7</sup> DCP 50/ml	+ Titre 10 <sup>4,9</sup> DCP 50/ml	_	_	-	-
1815	+	ND	-	_	ND	ND
1844	. +	ND	ND	-	ND	ND

Jx : Jour après l'inoculation

ND: Non Déterminé

Il est important de noter que, lors du prélèvement de la semence, toutes les précautions étaient prises pour que le sperme ou le flacon qui le recueille ne se contamine pas au contact de la muqueuse pituitaire ou en se mélangeant avec du liquide préputial. Seule, la dernière fraction de l'éjaculat était récoltée.

## c · recherche du virus dans les organes :

Aucun virus n'est isolé des cultures organotypiques et des broyats d'organes prélevés chez les trois verrats sacrifiés au terme de l'expérimentation. Le verrat lipide est abattu 79 jours après l'infection alors que les verrats 1844 et 1815 ont été sacrifiés plus précocement (30 et 50 jours après l'inoculation).

## d - recherche d'anticorps dans le sperme et le liquide préputial :

Les échantillons de sperme et de liquide préputial n'ont présenté aucune activité neutralisante vis-à-vis du virus de la maladie d'Aujeszky pendant toute la période expérimentale.

## 2 - Recherche d'un effet virulicide de la semence sur le virus de la maladie d'Aujesky :

Le virus non dilué titre 10<sup>6</sup> DCP 50/ml; soit 10<sup>5</sup> DCP 50/0,1 ml; le titre final du virus dilué au 1/6<sup>e</sup> est donc d'environ 10<sup>4,3</sup> DCP 50/0,1 ml. Aucune différence n'apparaît nettement, après les divers temps de contact, entre les titres du virus mélangé au sperme et le titre de la suspension utilisée comme témoin (tableau 4)

La semence de verrat ne semble pas inactiver le virus de la maladie d'Aujeszky après des temps de contact prolongés.

## III - DISCUSSION:

Dans nos conditions d'expérience, le virus de la maladie d'Aujeszky semble se multiplier activement dans les voies génitales de verrats infectés par voie préputiale puisque ce virus a été isolé des dernières fractions d'éjaculat 8 jours après l'inoculation expérimentale. De plus, le titre du virus a augmenté entre deux prélèvements consécutifs de semence et de liquides de lavages préputiaux effectués à 7 jours d'intervalle; le titre de ce virus aurait diminué si celui-ci avait persisté sans se multiplier dans la cavité préputiale.

L'excrétion virale a cependant été de courte durée puisqu'elle n'excède pas 10 jours.

La semence de verrat semble dépourvue d'effet virulicide vis-à-vis du virus de la maladie d'Aujeszky et aucune substance neutralisante n'a été décelée dans les divers prélèvements réalisés en cours d'expérimentation; en conséquence, il est peu probable que ce virus ait été neutralisé ou inactivé localement. La diffusion d'un virus par un porteur sain n'est qu'intermittente et varie probablement d'un individu à l'autre; la probabilité d'isoler ce virus excrété est augmentée en multipliant le nombre de prélèvements et le nombre d'animaux. Dans l'expérience relatée le nombre d'animaux fournissant régulièrement de la semence est faible, ce qui diminue les chances d'isoler le virus de la maladie d'Aujeszky.

La disparition du virus 10 jours après l'infection peut également provenir de l'apparition d'une immunité de type cellulaire qui ne peut être décelée par les techniques utilisées.

TABLEAU 4

EVOLUTION DU TITRE DU VIRUS DE LA MALDIE D'AUJESZKY MIS EN CONTACT,
DANS DES CONDITIONS DE TEMPS ET DE TEMPÉRATURES VARIABLES,
AVEC DE LA SEMENCE DE VERRAT, PAR RAPPORT A UNE SUSPENSION TÉMOIN

TEMPS DE CONTACT	TEMPÉRATURE DE CONTACT	MÉLANGE VIRUS + SPERME TITRE INITIAL 10 <sup>4,3</sup> DCP 50/0,1 ml	TÉMOIN VIRUS TITRE INITIAL 10 <sup>4,3</sup> DCP 50/0,1 ml
1 h	37°	10 <sup>7,1</sup> DCP 50/ml	10 <sup>7</sup> .1 DCP 50/ml
	25°	10 <sup>6,5</sup> DCP 50/ml	10 <sup>7,1</sup> DCP 50/ml
2 h	37°	10 <sup>7,1</sup> DCP 50/ml	10 <sup>7,1</sup> DCP 50/ml
	25°	10 <sup>6,9</sup> DCP 50/ml	10 <sup>7,1</sup> DCP 50/ml
3 h	37°	10 <sup>3,7</sup> DCP 50/ml	10 <sup>3,5</sup> DCP 50/ml
	25°	10 <sup>3,7</sup> DCP 50/ml	10 <sup>3,1</sup> DCP 50/ml
4 h	37°	10 <sup>4,1</sup> DCP 50/ml	10 <sup>3,9</sup> DCP 50/ml
	25°	10 <sup>3,5</sup> DCP 50/ml	10 <sup>3,7</sup> DCP 50/ml
6 h	37°	10 <sup>3,7</sup> DCP 50/ml	10 <sup>4</sup> , <sup>3</sup> DCP 50/ml
	25°	10 <sup>3,5</sup> DCP 50/ml	10 <sup>4,1</sup> DCP 50/ml
24 5	37°	10 <sup>2,5</sup> DCP 50/ml	10 <sup>2,5</sup> DCP 50/ml
24 h	25°	10 <sup>2,5</sup> DCP 50/ml	10 <sup>2,5</sup> DCP 50/ml
48 h	37°	1 DCP 50/ml	1 DCP 50/ml
	25°	1 DCP 50/ml	1 DCP 50/ml
5 j	37°	_	<del>-</del>
	25°	-	

Ces titres sont obtenus après inoculation du mélange ou de la suspension témoin sur cellules PK 15, ce qui explique leur augmentation par rapport au titre initial (voir matériel et méthodes).

#### **CONCLUSION:**

De nombreuses voies de transmission du virus de la maladie d'Aujeszky d'un animal contaminé à un animal sain sont connues. La dissémination du virus de la maladie d'Aujeszky par la voie vénérienne peut représenter un facteur épidémiologique important dans la contamination des reproducteurs surtout lors de l'utilisation des « verrats rouleurs » qui assurent la monte publique. Cette pratique est en voie de disparition dans les régions de production porcine intensive. En revanche la possibilité de transmettre le virus de la maladie d'Aujeszky par la semence de verrat peut représenter une menace pour des élevages isolés dans lesquels aucun reproducteur n'est introduit mais qui renouvellent leur patrimoine génétique par insémination artificielle. Dans nos conditions d'expérience l'excrétion du virus par les voies génitales du verrat semble limitée à une dizaine de jours après l'infection virulente : dans ces conditions, et comptetenu du contrôle sérologique régulier entrepris chez les verrats des centres d'insémination artificielle, la probabilité de transmission de la maladie d'Aujeszky par le biais de l'insémination artificielle est très faible. Dans ce domaine, comme dans beaucoup d'autres, l'insémination artificielle offre donc le maximum de garanties à l'éleveur soucieux de maintenir la qualité sanitaire de son cheptel.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur TOMA d'avoir bien voulu nous fournir la souche virale isolée au laboratoire de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort.

## **BIBLIOGRAPHIE:**

- DOCHERTY J. J. and CHOPAN M., 1974. The latent Herpes Simplex Virus. Bacteriol. Reviews, 38 (4), 337-355.
- 2 LAUTIE R., 1969. La maladie d'Aujeszky. Monographies : les maladies animales à virus. Editions : l'Expansion.
- 3 · SABO A., RAJCANI J., 1976. Latent Pseudorabies virus infection in Pigs. Acta virol. 20, 208-214.
- 4 SCRIBA M., 1975. Herpes Simplex virus infection in Guinea Pigs: an animal model for studying latent and recurrent Herpes Simplex virus infection, Inf. and Imm. 12 (1), 162-165.
- 5 SCRIBA M., 1976. Recurrent genital Herpes Simplex virus (H. S. V.) infection of Guinea pigs. Med. Microbiol. Immunol., 162, 201-208.