

P 963

## GASTROENTERITE TRANSMISSIBLE : STABILITE DU VIRUS DANS LE CONTENU GASTRIQUE ET INTESTINAL DE PORC

J.M. AYNAUD

I.N.R.A. - Laboratoire de Pathologie Porcine — 78850 THIVERVAL-GRIGNON (\*)

### INTRODUCTION

Le virus de la gastroentérite transmissible se multiplie de façon sélective dans les entérocytes de la muqueuse intestinale entraînant les conséquences que l'on connaît sur le plan pathologique. A la suite de sa pénétration dans l'organisme par voie orale, le virus fait l'objet d'un transit au terme duquel il atteint les entérocytes. site du développement viral, La survie du virus de la G.E.T., entre le moment de sa pénétration dans l'organisme au niveau de la cavité buccale et celui de son arrivée à son site de multiplication, conditionne tout le devenir ultérieur de l'infection virale. Le contenu de l'estomac possède une activité germicide dont l'intensité dépend d'une part de la composition chimique (concentration en acide chlorhydrique et en pepsine) qui est sous l'influence de l'âge de l'animal et de son état physiologique (LAPLACE 1974, RERAT et al. 1978), et d'autre part de la durée du séjour du virus dans la cavité gastrique.

Le virus qui a survécu à l'activité germicide du contenu gastrique, va entrer en contact au niveau du duodenum avec le liquide du contenu intestinal. Ce dernier est un mélange complexe riche en bile et en enzymes digestifs qui est susceptible d'exercer à son tour une activité germicide. On s'aperçoit donc que les conditions de la stabilité du virus dans le contenu stomacal et intestinal peuvent exercer une influence déterminante d'une part sur le nombre initial d'entérocytes infectés, et d'autre part sur la diffusion du virus des entérocytes infectés aux entérocytes sensibles.

La connaissance du devenir du pouvoir infectieux du virus de la G.E.T. dans les liquides de la lumière des différentes parties du tractus digestif est importante à plusieurs titres :

a) Pour la compréhension des mécanismes de la pathogénie virale durant les premières phases de l'infection du tractus digestif.

b) Pour la mise au point des conditions précises d'administration *per os*, soit d'une souche pathogène en vue d'un protocole d'infection virulente expérimentale, soit d'une souche atténuée en vue d'un protocole de vaccination à virus vivant. Dans ces deux cas, il est important de délivrer au niveau des entérocytes une suspension virale ayant conservé la plus grande partie de son pouvoir infectieux.

c) Enfin il est intéressant de comparer différentes souches entre elles afin de vérifier en particulier si une plus grande stabilité du virus caractérise les souches virulentes et si inversement les souches atténuées se révèlent plus fragiles.

Pour ces différentes raisons, nous avons entrepris l'étude de la stabilité du virus de la G.E.T. dans du contenu gastrique et intestinal prélevé à différents moments après le repas chez 22 porcs âgés de 3 à 6 mois.

Au cours de ce travail nous avons comparé 4 souches virulentes ayant un faible nombre de passages en culture cellulaire (souches « H.P. ») et 3 souches atténuées ayant subi un nombre élevé de passages (souches « H.P. »).

Les premiers résultats de ces recherches font l'objet de ce rapport.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **Cultures cellulaires et virus.**

Les cultures cellulaires et les souches du virus de la G.E.T. ont été décrites précédemment (H. LAUDE et al., 1981). Nous avons utilisé 4 souches « L.P. » ayant peu de passages en culture cellulaire (MILLER, D52, 6386, SH15) et 3 souches « H.P. » ayant subi un nombre élevé de passages (PURDUÉ 115, SH168, 137-SG.).

### **Titration du virus.**

Le pouvoir infectieux du virus de la G.E.T. est titré par la méthode des plages sous agarose en culture cellulaire (H. LAUDE et al., 1981).

### **Récolte et traitement du contenu gastrique et intestinal.**

Provenant d'un élevage conventionnel naisseur-engraisseur, les porcs sont abattus 15, 24 et 48 heures après le repas. Les contenus de l'estomac et de la totalité de l'intestin grêle sont récoltés et aussitôt centrifugés à + 4°C pendant 60 minutes à 15.000 t/mn. Les surnageants sont prélevés, répartis en aliquots de 1,8 ml et congelés aussitôt à - 70°C.

Le pH du contenu gastrique est mesuré pour chacun des échantillons prélevés.

### **Test de stabilité du virus.**

Chaque souche de virus est diluée au 1/10 (v/v) à raison de 0,2 ml dans 1,8 ml de chacun des échantillons de contenu gastrique ou de contenu intestinal. Les mélanges sont immédiatement placés dans un bain-marie à 38°C. En fonction du temps, des prélèvements de 0,2 ml sont effectués et dilués aussitôt dans 1,8 ml de milieu Eagle additionné de 10 % de sérum de veau et conservé dans la glace fondante. Le titrage du pouvoir infectieux résiduel des échantillons ainsi prélevés est réalisé immédiatement.

## **RÉSULTATS**

### **A) Stabilité du virus de la G.E.T. dans le contenu gastrique.**

Les résultats sont présentés dans le tableau N° 1. On note les faits suivants :

a) – Soit le virus reste stable, c'est le cas avec les échantillons dont le pH est supérieur à 2,5 (sauf pour les échantillons N° 37, 86 et 94 lesquels on observe une inactivation modérée conduisant à une diminution de titre infectieux inférieure à 1,6 log).

**TABEAU 1**  
 ACTIVITÉ GERMICIDE *IN VITRO* (1) DU CONTENU GASTRIQUE VIS-À-VIS  
 DU VIRUS DE LA G.E.T., MESURÉE PAR LA DIMINUTION DU POUVOIR INFECTIEUX VIRAL  
 (RÉSULTATS ANALYTIQUES)

| CONTENU GASTRIQUE |                       |     | SOUCHES DU VIRUS DE LA G.E.T. |       |       |       |                      |        |        |
|-------------------|-----------------------|-----|-------------------------------|-------|-------|-------|----------------------|--------|--------|
|                   |                       |     | SOUCHES « L.P. » (2)          |       |       |       | SOUCHES « H.P. » (3) |        |        |
| N° DU PORC        | HEURES APRÈS LE REPAS | pH  | Miller                        | D52   | 6386  | SH.15 | Purdue               | SH.168 | 137.SG |
| 67                | 7                     | 3,6 | < 0,1(4)                      | 0,2   | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1                | < 0,1  | 0,1    |
| 65                | 15                    | 1,4 | > 3,8                         | 4,4   | 4,0   | > 3,2 | > 4,4                | 2,5    | > 3,2  |
| 7                 | 15                    | 1,6 | > 4,0                         | > 4,0 | > 4,0 | > 3,2 | > 4,0                | > 4,0  | > 3,2  |
| 66                | 15                    | 2,1 | 3,3                           | > 4,4 | 4,0   | > 3,2 | 3,4                  | > 3,1  | > 3,2  |
| 54                | 15                    | 2,4 | 2,4                           | 3,3   | 2,5   | 1,2   | 3,4                  | 1,6    | 1,1    |
| 38                | 24                    | 1,6 | > 3,8                         | > 4,4 | > 4,5 | > 3,2 | > 4,4                | > 3,7  | > 3,2  |
| 95                | 24                    | 2,0 | 3,7                           | 4,1   | 4,0   | > 3,2 | > 4,4                | 2,6    | > 3,2  |
| 90                | 24                    | 2,1 | 2,7                           | 3,2   | 3,8   | 2,7   | 4,4                  | 3,0    | > 3,2  |
| 88                | 24                    | 3,4 | 0,7                           | 0,2   | < 0,1 | < 0,1 | 0,3                  | < 0,1  | < 0,1  |
| 97                | 24                    | 3,8 | < 0,1                         | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1                | < 0,1  | < 0,1  |
| 64                | 24                    | 4,2 | < 0,1                         | 0,2   | 0,1   | < 0,1 | < 0,1                | 0,3    | < 0,1  |
| 63                | 24                    | 4,3 | < 0,1                         | < 0,1 | 0,3   | < 0,1 | < 0,1                | < 0,1  | < 0,1  |
| 86                | 24                    | 4,7 | 0,7                           | 1,2   | 1,7   | 1,6   | 0,7                  | 1,4    | 0,9    |
| 94                | 24                    | 4,9 | 0,4                           | 0,8   | < 0,1 | < 0,1 | 0,6                  | 0,2    | < 0,1  |
| 61                | 48                    | 1,6 | > 3,8                         | 4,0   | > 4,5 | 3,0   | > 4,4                | 3,7    | > 3,2  |
| 62                | 48                    | 2,5 | 3,5                           | 3,8   | 2,8   | 1,9   | 2,2                  | 2,5    | 2,0    |
| 36                | 48                    | 3,5 | < 0,1                         | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1                | < 0,1  | < 0,1  |
| 37                | 48                    | 5,9 | 0,4                           | 0,5   | 0,5   | 0,1   | < 0,1                | 0,3    | < 0,1  |

(1) pendant 10 minutes à 38°C.

(2) souches ayant un faible nombre de passages en culture.

(3) souches ayant un nombre élevé de passages en cellule.

(4) baisse du titre infectieux du virus en log. 10.

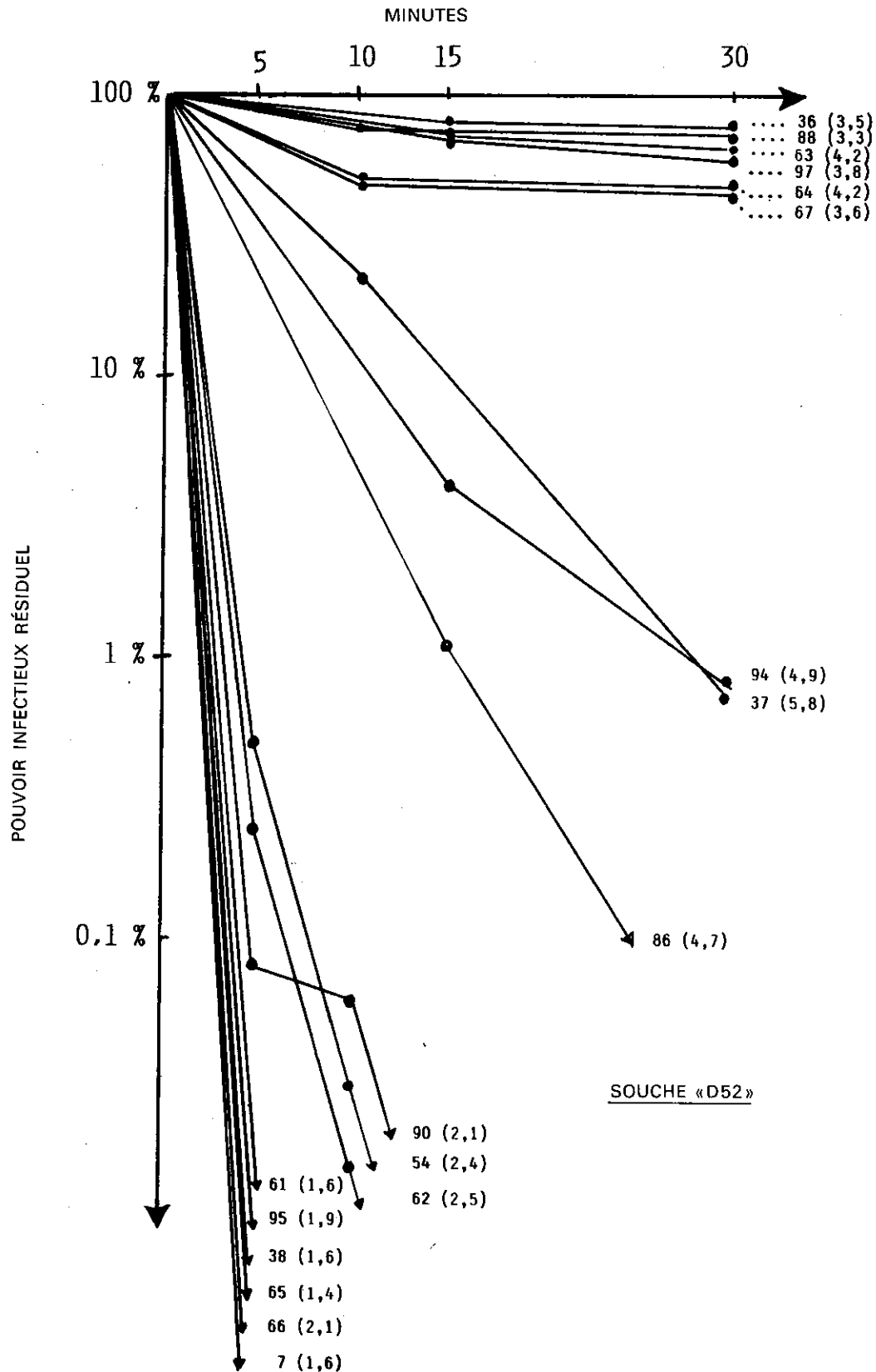
**TABEAU 2**  
 ACTIVITÉ GERMICIDE DU CONTENU GASTRIQUE VIS-À-VIS DU VIRUS DE LA G.E.T. ;  
 INFLUENCE DU pH ET DU MOMENT DE PRÉLÈVEMENT APRÈS LE REPAS

|                             |         | MOMENT DU PRÉLÈVEMENT<br>(HEURES APRÈS LE REPAS) |           |           |           |
|-----------------------------|---------|--|-----------|-----------|-----------|
|                             |         | 7 heures   | 15 heures | 24 heures | 48 heures |
| NOMBRE TOTAL D'ÉCHANTILLONS |         | 1  | 4         | 12        | 6         |
| pH ≤ 2,5                    |         | 0  | 4         | 3         | 2         |
| ACTIVITÉ GERMICIDE          | MODÉRÉE | 0  | 0         | 1         | 0         |
|                             | INTENSE | 0  | 4         | 3         | 2         |

FIGURE 1

CINÉTIQUE D'INACTIVATION DE LA SOUCHE D52 DU VIRUS DE LA G.E.T.  
DANS 18 ÉCHANTILLONS DIFFÉRENTS DE CONTENU GASTRIQUE PRÉLEVÉ 7, 15, 24 ET 48 HEURES  
APRÈS LE DERNIER REPAS.

Pour chaque courbe, le premier chiffre indique le numéro du porc chez lequel le contenu gastrique a été prélevé,  
le deuxième chiffre entre parenthèse indique le pH de l'échantillon.



b) – Soit le virus subit une inactivation d'intensité variable selon les échantillons. Ainsi avec les N° 54 et 62 dont le pH est respectivement 2,4 et 2,5, la perte de titre infectieux est seulement de 1,2 à 3,8 selon la souche de virus. En revanche avec les échantillons N° 7, 38, 61, 65, 66, 90 et 95 dont le pH est inférieur ou égal à 2,1, l'inactivation est intense et varie de 2,6 log à 4,5 log et au-dessus.

Dans la figure 1 nous avons présenté à titre d'exemple la cinétique d'inactivation du virus pour la souche D52 (souche isolée en Bretagne par le Dr. Ph. VANNIER, et ayant fait l'objet de 5 passages en culture de cellules). On peut se rendre compte que tous les échantillons dont le pH est inférieur ou égal à 2,5 exercent une intense activité virulicide puisque le virus perd 99,9 % et plus de son pouvoir en 5 minutes.

**TABLEAU 3**  
ACTIVITÉ GERMICIDE *IN VITRO* (1) DU CONTENU DE L'INTESTIN GRÈLE VIS-A-VIS  
DU VIRUS DE LA G.E.T., MESURÉE PAR LA DIMINUTION DU POUVOIR INFECTIEUX VIRAL  
(RÉSULTATS ANALYTIQUES)

| CONTENU INTESTINAL |                       | SOUCHES DU VIRUS DE LA G.E.T. |       |       |       |                      |        |        |
|--------------------|-----------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|----------------------|--------|--------|
|                    |                       | SOUCHES « L.P. » (2)          |       |       |       | SOUCHES « H.P. » (3) |        |        |
| N° DU PORC         | HEURES APRÈS LE REPAS | Miller                        | D52   | 6386  | SH.15 | Purdue               | SH.168 | 137.SG |
| 67                 | 7                     | N.D.                          | 1,1   | N.D.  | 0,8   | 1,2                  | 0,5    | 0,7    |
| 6                  | 15                    | > 4,0(4)                      | > 4,0 | > 4,0 | > 3,2 | > 4,0                | > 4,0  | > 3,2  |
| 54                 | 15                    | 0,7                           | 1,0   | N.D.  | 1,0   | 0,3                  | 0,5    | 0,7    |
| 65                 | 15                    | > 3,8                         | > 4,4 | > 4,0 | > 3,2 | > 4,4                | > 3,7  | > 3,2  |
| 66                 | 15                    | > 3,8                         | > 4,4 | 4,0   | > 3,2 | > 4,4                | > 3,7  | > 3,2  |
| 67                 | 15                    | 1,6                           | 1,1   | 1,4   | 1,8   | 1,7                  | N.D.   | N.D.   |
| 5                  | 24                    | < 0,1                         | < 0,1 | N.D.  | 0,1   | < 0,1                | < 0,1  | < 0,1  |
| 97                 | 24                    | < 0,1                         | 0,4   | "     | 0,8   | < 0,1                | 0,5    | < 0,1  |
| 94                 | 24                    | < 0,4                         | 0,7   | "     | 0,9   | 0,7                  | 0,6    | < 0,1  |
| 90                 | 24                    | 0,5                           | 0,5   | "     | 1,0   | 0,3                  | 0,6    | < 0,1  |
| 88                 | 24                    | < 0,1                         | 0,2   | "     | 0,5   | 0,2                  | 0,5    | < 0,1  |
| 86                 | 24                    | 0,5                           | 0,3   | "     | 1,0   | 0,3                  | 1,1    | < 0,1  |
| 38                 | 24                    | 0,4                           | 0,2   | "     | 0,4   | 0,3                  | 0,5    | < 0,1  |
| 95                 | 24                    | 1,2                           | 1,3   | "     | 1,5   | 1,0                  | 0,6    | < 0,1  |
| 92                 | 24                    | > 3,8                         | 4,2   | "     | > 3,2 | > 3,4                | 3,5    | > 3,2  |
| 89                 | 24                    | 3,2                           | 3,3   | "     | > 3,2 | > 3,4                | 3,5    | > 3,2  |
| 64                 | 24                    | 3,8                           | > 4,4 | "     | > 3,2 | > 4,4                | > 3,7  | > 3,2  |
| 63                 | 24                    | 2,6                           | > 4,0 | "     | > 3,2 | 4,4                  | > 3,0  | 2,5    |
| 8                  | 24                    | > 3,8                         | > 4,0 | "     | > 3,2 | > 4,0                | > 3,0  | > 3,2  |
| 37                 | 48                    | < 0,1                         | < 0,1 | "     | 0,8   | < 0,1                | < 0,1  | < 0,1  |
| 62                 | 48                    | 0,6                           | 0,2   | "     | 1,0   | 0,9                  | 1,4    | < 0,1  |
| 61                 | 48                    | > 3,8                         | 3,4   | "     | > 3,8 | 1,1                  | 3,0    | 1,0    |

(1) pendant 10 minutes à 38°C.

(2) souches ayant un faible nombre de passages en culture.

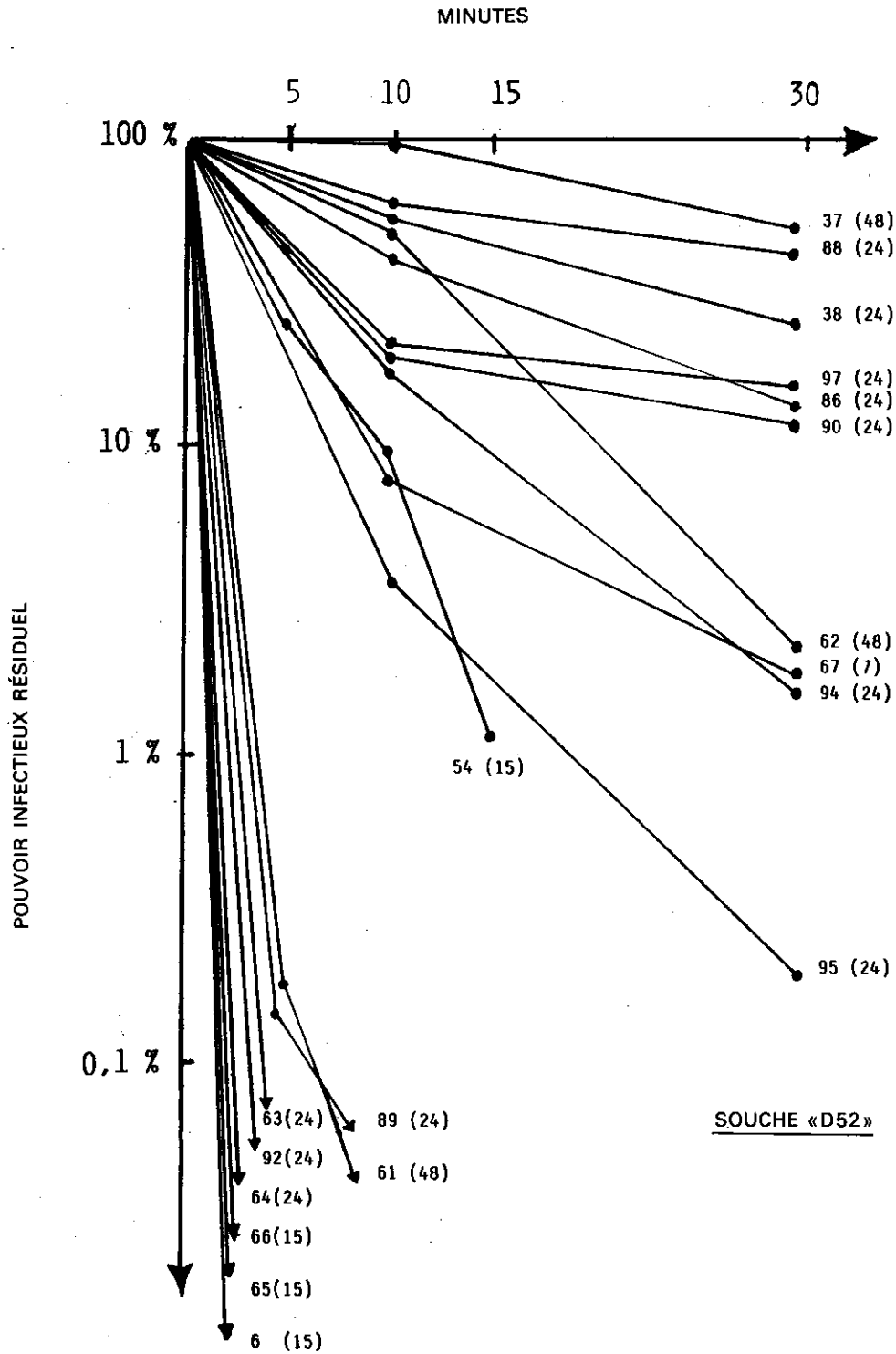
(3) souches ayant un nombre élevé de passage en culture.

(4) baisse du titre infectieux du virus en log. 10.

FIGURE 2

CINÉTIQUE D'INACTIVATION DE LA SOUCHE D52 DU VIRUS DE LA G.E.T.  
DANS 19 ÉCHANTILLONS DIFFÉRENTS DE CONTENU INTESTINAL PRÉLEVÉS 7, 15, 24 ET 48 H.  
APRÈS LE DERNIER REPAS.

Pour chaque courbe le premier chiffre indique le numéro du porc chez lequel le contenu intestinal a été prélevé, le deuxième chiffre entre parenthèses indique le temps en heures entre le dernier repas et l'abattage.



**TABEAU 4**  
**ACTIVITÉ GERMICIDE DU CONTENU INTESTINAL VIS-À-VIS DU VIRUS DE LA G.E.T. ;**  
**INFLUENCE DU MOMENT DE PRÉLÈVEMENT APRÈS LE REPAS**

|                                   | MOMENT DU PRÉLÈVEMENT<br>(HEURES APRÈS LE REPAS) |           |           |
|-----------------------------------|--|-----------|-----------|
|                                   | 15 heures  | 24 heures | 48 heures |
| NOMBRE TOTAL<br>D'ÉCHANTILLONS    | 5  | 13        | 3         |
| ACTIVITÉ }<br>GERMICIDE } MODÉRÉE | 2  | 4         | 1         |
| } INTENSE                         | 3  | 5         | 1         |

De ces résultats (tableau N°2), il ressort que le virus de la G.E.T. est rapidement inactivé par tous les contenus gastriques dont le pH est inférieur à 2,5. Ces derniers se trouvent avec une plus grande fréquence chez les animaux abattus 15 heures après le repas.

Par ailleurs, s'il y a des différences de stabilité d'une souche à l'autre pour le même échantillon (c'est le cas des N° 54 et 62), en revanche, il n'y a pas de différences significatives entre le groupe des souches « H.P. » et le groupe des souches « L.P. ». Ce qui confirme nos résultats précédents (H. LAUDE et al., 1981).

### **B) Stabilité du virus de la G.E.T. dans le contenu intestinal.**

Les échantillons sont présentés dans les tableaux N° 3 et 4. Sur les 22 échantillons, 5 sont dépourvus d'activité germicide, 7 présentent une activité modérée et 9 se révèlent intensément inactivants pour le virus. Dans la figure N° 2, nous avons présenté à titre d'exemple la cinétique d'inactivation du virus pour la souche D52. De ces courbes, il ressort que 8 échantillons sont capables d'inactiver rapidement le virus puisque ce dernier perd 99,9 % et même plus de son pouvoir infectieux en 5 minutes.

Inversement, des échantillons présentent peu ou pas d'activité virulicide. Ces derniers se retrouvent exclusivement à 24-48 heures après le dernier repas.

Il y a des différences de stabilité d'une souche à l'autre pour le même échantillon. C'est le cas des échantillons N° 62, 63, 86 et 95. En revanche, il n'y a pas de différences significatives entre le groupe des souches « L.P. » et le groupe des souches « H.P. », ce qui confirme à nouveau nos résultats précédents.

## **DISCUSSION**

**A) Nos résultats révèlent la fragilité du coronavirus de la G.E.T. dans les liquides présents dans la cavité de l'estomac et dans la lumière de l'intestin grêle.**

- Sur les 18 échantillons de contenu gastrique analysés, 8 seulement se révèlent dépourvus d'acidité virulicide. Ces derniers se retrouvent avec une plus grande fréquence dans les prélèvements effectués 24-48 heures après le dernier repas. Si l'on considère les 13 échantillons restants, il est clair qu'il existe une relation entre l'intensité de l'activité virulicide et le niveau de l'acidité stomacale.
- Sur les 22 échantillons de contenu intestinal, 5 seulement se révèlent dépourvus d'activité virulicide, et ces derniers se retrouvent uniquement dans les prélèvements effectués 24-48 heures après le dernier repas.

● Au cours de ce travail nous avons comparé 7 souches différentes de virus. Nos résultats confirment ceux obtenus antérieurement (MOSCARI, 1980), (LAUDE et coll., 1981). Il

avait en effet été établi que contrairement à ce qui était publié auparavant (FURUUCHI et al. 1975, HESS et al. 1977), il n'y avait pas de corrélation entre la stabilité *in vitro* à divers traitements enzymatiques (enzymes digestives) et physicochimiques (pH, chaleur) et le degré de virulence ou le niveau de passage en culture cellulaire des différentes souches du virus de la G.E.T.

**B) Nos résultats apportent des données nouvelles** sur les propriétés du coronavirus de la G.E.T. dont il faudra tenir compte dans l'avenir d'une part pour la mise en œuvre des techniques d'infection ou d'immunisation de la truie par voie orale, et d'autre part pour la compréhension de l'épidémiologie de la G.E.T. à l'échelon d'un troupeau.

- Lors de l'administration par voie orale, il faut faire en sorte que la suspension virale délivrée par l'expérimentateur ne subisse pas d'inactivation au cours de son transit jusqu'aux entérocytes. Compte-tenu de nos résultats il convient donc :

- 1) Soit d'intervenir au niveau du virus en le protégeant à la faveur d'un enrobage (capsule), ou en choisissant une souche particulière plus résistante à l'action virulicide du milieu ambiant.

- 2) Soit d'intervenir au niveau de l'animal en le plaçant au moment de l'administration dans un état physiologique approprié (jeûne, traitement pharmacologique) permettant une meilleure survie du virus dans le tractus digestif. Ces nouvelles données pourraient peut-être expliquer, en partie du moins, certains résultats médiocres de la vaccination par voie orale et en particulier les grandes variations observées parfois d'une truie à une autre.

- A la lumière de nos résultats, on peut se poser la question suivante : comment se déroulent les premières phases de l'infection chez le porc adulte dans les conditions naturelles et comment se propage par exemple la maladie sur le terrain au sein d'un troupeau de reproducteurs ?

La microépidémiologie au niveau d'un élevage est un problème complexe et il est probable que plusieurs facteurs interviennent de façon complexe : la dose de virus, l'enrobage des particules virales par des substances de toute sorte, la fréquence des contaminations, l'état physiologique de l'animal, le mode d'alimentation (*ad libitum*) ou pas, liquide ou solide).

## BIBLIOGRAPHIE

- FURUUCHI S., SHIMIZU Y. et KUMAGAI T. 1975. Comparison of properties between virulent and attenuated strains of transmissible gastroenteritis virus. Natl. Inst. Anim. Health. Q., **15**, 159-164.
- HESS R.G., BACHMANN P.A., 1977. *In vitro* differentiation and pH sensitivity of field and cell culture attenuated strains of transmissible gastroenteritis virus. Infect. Immun., **13**, 1624-1646.
- LAPLACE J.P., 1974. Enregistrement du pH intragastrique chez le porc. Variations liées à la nature, à l'importance et à l'intervalle des repas chez l'animal en finition. Ann. Zootech. **23**, 89-104.
- LAUDE H., GELFI J. et AYNAUD J.M., 1981. *In vitro* properties of low and high passaged strains of transmissible Gastroenteritis coronavirus of swine. Am. J. Vet. Res. **42**, 447-449.
- MOSCARI E., 1980. Physicochemical properties of field and cell culture- attenuated strain of swine transmissible gastroenteritis (TGE) coronavirus. Acta Vet. Hung. **28**, 341-350.
- RERAT A., CORRING T. et LAPLACE J.P., 1978. Quelques aspects des recherches en physiologie digestive chez le porc : applications possibles. Journées Rech. Porcine en France. p. 95-118.