

UTILISATION DE L'ÉLISA DANS LA DÉTECTION DES ANTICORPS SÉRIQUES ANTI-*ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* (SÉROVARS 2 ET 9) AU SEIN DE QUELQUES ÉLEVAGES PORCINS

Marylène KOBISCH (1), S. LARIVIERE (2), P. MORVAN (1), Annie LABBE (1) F. DE LASALLE (2)
H. GUILMOTO (3), J.C. PINAULT (3), L. GOELLO (4), J. BRIANT (4), J. PICARD (4).

(1) CNEVA - LCRAP - Station de Pathologie Porcine - BP 53 - Les Croix - 22440 Ploufragan.

(2) Université de Montréal - Faculté de Médecine Vétérinaire - CP 5000 - St-Hyacinthe - Québec - J2S 7C6 - Canada.

(3) COOPERL - Z.I. - BP 115 - 22403 Lamballe Cédex.

(4) Direction des Services Vétérinaires des Côtes d'Armor - rue du Sabot - 22440 Ploufragan.

Les Sérovars 2 et 9 d'*A. pleuropneumoniae* induisent de la mortalité, des symptômes cliniques sévères, de la pleuropneumonie accompagnée de pleurésie et de péricardite chez des porcelets infectés expérimentalement. Les examens histologiques montrent des lésions sévères de pleuropneumonie nécrotique et fibrino-hémorragique. L'ELISA permet de révéler une séroconversion après une à deux semaines chez les porcs résistant à l'infection.

Dans les conditions de la pratique, aucun séropositif n'a été détecté chez les animaux appartenant à deux troupeaux de sélection. Des anticorps d'origine maternelle sont mis en évidence chez des porcelets de 4 semaines d'âge, provenant d'élevages infectés (sérovarys 2 et 9). Ces animaux sont séronégatifs à l'âge de 8 semaines. La séroconversion est généralement observée entre 16 et 22 semaines. Dans les élevages infectés, les truies sont séropositives. L'ELISA se révèle être un outil efficace pour diagnostiquer les infections chroniques.

An Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) for the sero-detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection (serotypes 2 and 9)

A. pleuropneumoniae, serotypes 2 and 9 induced mortality, severe clinical symptoms, pleuropneumonia, pleurisy and pericarditis in piglets experimentally infected. The histology was typical of an acute necrotizing-fibrino haemorrhagic pleuropneumonia. ELISA was evaluated in 3 remaining pigs, infected with serotype 9, they seroconverted from 1 to 2 weeks after infection.

In field conditions, no seropositive pigs were shown in 2 breeding herds. Maternal antibodies were detected in 4 weeks old piglets from infected herds serovarys 2 and 9. These piglets were seronegative at 8 weeks of age. Seroconversion was observed mainly between 16 to 22 weeks. In the infected herds, the sows were seropositive. ELISA is a very effective mean of finding chronically infected pigs and herds.

INTRODUCTION

La pleuropneumonie porcine est une entité pathologique décrite il y a une trentaine d'années (MATTEWS et PATTISSON, 1961 SHOPE, 1964 ; NICOLET et KONIG, 1966) et dont l'agent étiologique est *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. L'industrialisation de la production porcine a provoqué l'extension de cette maladie qui devient préoccupante dans de nombreux pays, par les pertes économiques qu'elle entraîne. Des études taxonomiques récentes ont porté à cinquante le nombre d'espèces bactériennes regroupées dans la famille des *Pasteurellaceae* qui comporte les genres *Haemophilus*, *Actinobacillus* et *Pasteurella* (POHL et al, 1988). *Actinobacillus pleuropneumoniae* (A.p.) comporte deux biovars : le biovar 1 exige pour se développer la présence de Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide (NAD) ou facteur V (une co-déshydrogénase de la chaîne respiratoire) qu'il ne peut synthétiser, le biovar 2 ne présente pas cette dépendance. On distingue actuellement sur la base des polysaccharides capsulaires, 12 sérovars (de 1 à 12, le sérovar 5 se divisant en deux sous-types selon NIELSEN, 1986). Certains sérovars possédant des déterminants antigéniques communs, sont réunis en sérogroupes (1-9-11 ; 4-7 et 3-6-8).

En France, une enquête épidémiologique effectuée à partir d'animaux présentant de la pleuropneumonie, de la pleurésie ou des territoires de nécrose enkystés au niveau du tissu pulmonaire, révèle la dominance des sérovars 9 et 2. En effet, parmi 203 souches d'A.p. analysées, 88 (44 %) appartiennent au Sérovar 9 et 60 (29,5 %) concernent le Sérovar 2 du biovar 1 ou du biovar 2 (KOBISCH et al, sous presse). Le caractère endémique de l'infection a conduit à effectuer un dépistage sérologique des animaux contaminés. Cette méthode a été utilisée avec profit en Suisse (NICOLET, 1987) ou au Canada (LARIVIERE et al, 1990). Nous avons choisi la technique ELISA pour détecter les anticorps sériques chez des animaux d'élevages infectés ou non par le Sérovar 2 ou le Sérovar 9 d'A.p.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Infections expérimentales

- 8 porcs de la porcherie protégée de la Station Porcine ont été infectés par voie nasale (0,5 ml par narine) à l'âge de 14 semaines à l'aide d'une suspension bactérienne dont le titre est de 10^6 /ml. La souche d'A.p. appartenant au Sérovar 9, a été isolée chez un porc présentant de la pleuropneumonie et a été cultivée 6 heures à 37°C dans un milieu PPLO-NAD-sérum.
- 8 autres porcs infectés dans les conditions précédemment décrites, reçoivent une molécule dans l'aliment (300 ppm) durant 7 jours consécutifs (le début du traitement ayant lieu 24 heures avant l'infection)
- 8 porcs non infectés constituent le lot témoin négatif et reçoivent le milieu de culture dans les conditions précédemment décrites.
- 4 porcs de la porcherie protégée sont infectés selon les conditions décrites au paragraphe précédent, à l'aide du Sérovar 2 (biovar 1) isolé chez un porc présentant, à l'abattoir, des territoires de nécrose au niveau du tissu pulmonaire.

- Des ponctions sanguines ont été effectuées chaque semaine chez les animaux qui survécurent à l'infection.

1.2. Choix des élevages de porcs et protocole expérimental

- Sept élevages de production qui ont été infectés par A.p. dans le passé (les Sérovars 2-3-8 ou 9 ont été isolés) et deux élevages de sélection à partir desquels A.p. n'a jamais été isolé sont retenus pour cette étude.
- Le protocole expérimental a consisté à effectuer des ponctions sanguines chez des animaux de chacun des 9 élevages : 10 porcelets de 4 semaines, 10 porcs de 8 semaines, 10 porcs de 18 semaines et 10 truies (PS1). Une seconde ponction sanguine (PS2) a été réalisée 4 semaines plus tard, chez les mêmes animaux. Au moment de l'intervention dans les différents élevages on n'observe ni mortalité, ni signes d'infection aiguë à A.p.. Simultanément, les poumons de porcs charcutiers provenant de ces différents élevages sont observés à l'abattoir. Dix pour cent des organes lésés subissent un examen bactériologique.
- La technique ELISA utilisée est celle qui a été décrite par GOYETTE (1986) et adaptée au Sérovar 9 (souche de référence CVJ 13 261 et au Sérovar 2 (souche de référence 1536).

2. RÉSULTATS

2.1. Infections expérimentales

- *Les 8 porcs infectés par le Sérovar 9 d'A.p.*, meurent entre 24 h et 48 heures après l'infection expérimentale en présentant une hyperthermie (supérieure à 41°C° dès la deuxième heure suivant l'infection) accompagnée de difficultés respiratoires et parfois de signes nerveux. L'examen post-mortem révèle l'existence de pleuropneumonie hémorragique associée à une pleurésie chez la plupart des animaux dont certains présentent également une péricardite. A.p. est réisolé dans chacun des cas à partir des poumons, des amygdales et des cavités nasales.
- *Parmi les 8 porcs infectés par le Sérovar 9 d'A.p. et traités par la molécule*, 5 meurent dans les conditions précédemment décrites. Trois porcs survivent à l'infection et sont sacrifiés 3 semaines plus tard : deux d'entre eux sont totalement dépourvus de lésions, le troisième montre une pleurésie et de nombreux territoires de nécrose enkystés dans le tissu pulmonaire. A.p. n'est pas réisolé chez ces 3 porcs survivants mais est présent chez les 5 autres porcs, au niveau des poumons, des cavités nasales et des amygdales. Les anticorps sériques sont recherchés chez les 3 animaux qui ont résisté à l'infection (figure 1). La séroconversion est mise en évidence, chez les trois porcs, entre la première et la seconde semaine après l'infection, ce qui signifie que ces animaux ont été infectés.
- *Les 8 porcs non infectés* sont à la fois dépourvus de lésions et séronégatifs.
- *Les 4 porcs infectés par le Sérovar 2 d'A.p.*, meurent 24 heures après l'infection en présentant une température corporelle de 42°C, des difficultés respiratoires et un épistaxis. L'autopsie révèle des lésions de pleuropneumonie hémorragique accompagnée d'une pleurésie dans 3 cas. A.p. est réisolé chez les 4 porcs.

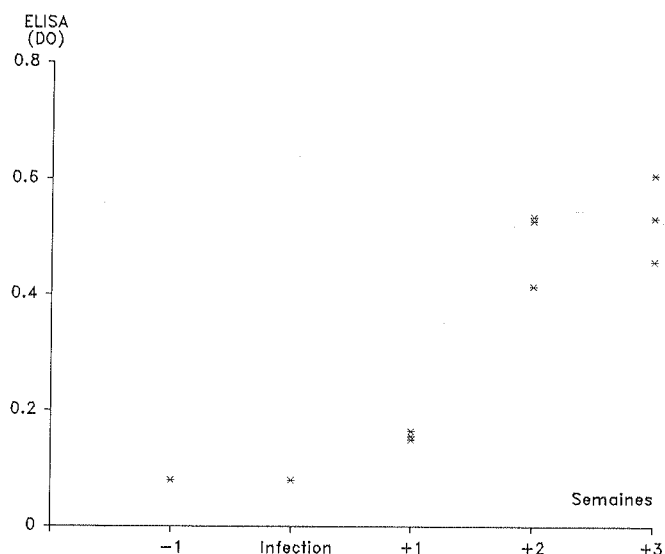
Au plan histologique, les examens montrent des lésions sévères de pleuropneumonie nécrotique et hémorragique. L'infiltration inflammatoire comporte essentiellement des polynucléaires neutrophiles au niveau de la plèvre et des cloisons inter-lobulaires. Ces lésions s'accompagnent d'une «alvéolite leucocytaire». Les observations sont identiques quel que soit le Sérovar.

2.2. Examens à l'abattoir et résultats microbiologiques

Le tableau 1 présente le résultat des observations effectuées à partir de 60 poumons d'animaux provenant des 9 élevages. Les 60 porcs appartenant respectivement aux deux élevages de sélection, sont dépourvus de lésions et n'hébergent pas de flore pathogène spécifique.

La plupart des porcs issus des 7 élevages de production, présentent de la pneumonie au moment du contrôle et l'étendue des lésions varie de 4 à 10 (28 correspondant à une étendue maximale). 18 porcs de l'élevage 5 ont de la pleuropneumonie au moment du sacrifice. Les lésions de la plèvre concernent 6 élevages et 4 d'entre eux ont également des animaux montrant des lésions du péricarde. Des territoires de nécrose enkystés dans le tissu pulmonaire sont observés chez certains animaux appartenant aux 7 élevages. A.p. est mis en évidence dans 5 élevages : Biovar 1, Sérovats 2, 3, 8 ou 9 ; Biovar 2, Sérovar 2. Les animaux des élevages 1 et 4 ne se sont pas montrés contaminés par A.p., au moment du contrôle,

FIGURE 1
CINÉTIQUE DES ANTICORPS SÉRIQUES CHEZ 3 ANIMAUX
INFECTÉS PAR A.p. SÉROVAR 9



cependant, ce germe (B1S9) a été isolé dans ces 2 élevages lors d'un épisode aigu de pleuropneumonie. *P. multocida*, de groupe capsulaire A, non toxigène est présente dans les

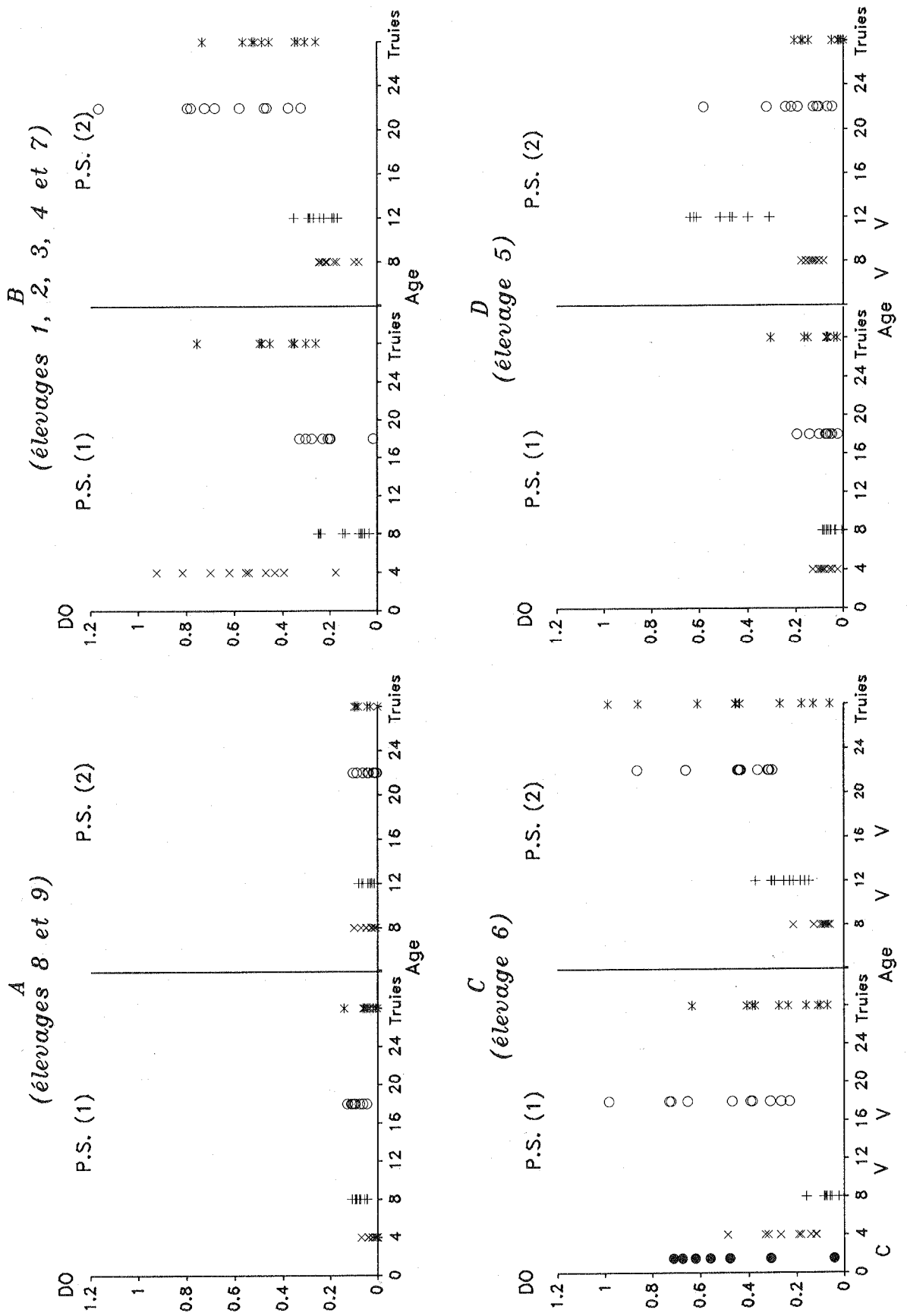
TABLEAU 1
RÉSULTATS DES OBSERVATIONS EFFECTUÉES À PARTIR DE 60 ANIMAUX DES 9 ÉLEVAGES

Elevages	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lésions	P*	P	P	P	P	P	P	S**	S
Pneumonie N/60 N/28	51 10	28 4	54 10	57 7	60 9	53 8	52 6	0 0	0 0
Pleuropneumonie N/60	0	0	0	0	18	0	0	0	0
Pleurésie N/60	23	0	8	7	18	7	26	0	0
Péricardite N/60	5	0	8	1	12	0	0	0	0
Territoires de nécrose N/60	5	5	10	8	24	9	12	0	0
Isolement Ap N/6	0 ***	1(B ₁ S ₉)	2(B ₁ S ₉) ***	0 B ₁ S ₉	5(B ₁ S ₈)	1(B ₂ S ₂) B ₁ S ₃	1(B ₁ S ₂)	0	0
Isolement Pm N/6	4 ****	6	5	6	2	1	2	0	0
Autres Bactéries N/6						S.suis 2 4			

P* élevage de production ; S** élevage de sélection ;

*** B₁S₉(contrôle précédent) ; **** A,DNT-

FIGURE 2
 PROFILS SÉROLOGIQUES DES 9 ÉLEVAGES (Ap B1 S9)



7 élevages. *Streptococcus suis* 2 est également isolé chez les porcs de l'élevage 5.

2.3. Détection des anticorps sériques chez les animaux des 9 élevages

- Sérovar 9

Les animaux des 2 élevages de sélection sont totalement dépourvus d'anticorps sériques vis-à-vis de ce sérovar (figure 2A).

Les profils sérologiques des élevages 1, 2, 3, 4 et 7 sont très semblables (figure 2B). Les porcelets de 4 semaines d'âge ont des anticorps d'origine maternelle dont le taux diminue progressivement pour atteindre le seuil de signification (O.200-O.250) lorsque les porcs atteignent 8 semaines. Une séroconversion est observée chez les animaux entre 12 et 22 semaines, ce qui correspond à la phase d'engraissement. Les truies de ces élevages (qui ne correspondent pas aux porcelets examinés) sont également séropositives. Dans le cas des élevages 1, 2, 3, 4, les résultats sérologiques confirment l'existence du B1S9 d'A.p. Ce même Sérovar est également présent chez les animaux de l'élevage 7, à partir desquels seuls les sérovats 2 et 3 avaient été isolés. Les profils des élevages 5 et 6 (figure 2C et D) sont un peu différents car les éleveurs utilisent un autovaccin (B1S9). Dans l'élevage 6, le protocole de vaccination est établi depuis plusieurs années. Les porcs sont vaccinés à 11 semaines puis à 16 semaines d'âge. Les truies sont vaccinées 3 semaines avant la parturition. Il existe, dans cet élevage, une pathologie respiratoire chronique qui se manifeste par des lésions pulmonaires (pneumonie, pleurésie, abcès), la présence de germes pathogènes spécifiques (A.p.B2S2 et *P. multocida*) et une croissance médiocre des animaux (190 jours en moyenne pour atteindre la vente). Cependant, la vaccination de tous les animaux empêche la mortalité et la multiplication du B1S9 qui était régulièrement isolé chez les animaux morts. Le profil sérologique de cet élevage (figure 2C) montre, lors de la première ponction sanguine, la présence d'anticorps anti Sérovar 9, dans le colostrum des truies. Les porcelets de

4 semaines d'âge ont encore des anticorps d'origine maternelle, mais à 8 semaines, leur taux est au-dessous du seuil de signification. Deux semaines après le rappel de vaccination qui intervient à 18 semaines, le taux d'anticorps est élevé. Le contrôle effectué 4 semaines plus tard montre une stabilité du taux des anticorps. Chez les truies, les taux sont très hétérogènes : les truies les plus vieilles ont dans l'ensemble le taux le plus élevé. Dans le cas de cet élevage, la sérologie a confirmé l'existence d'anticorps anti-Sérovar 9 induits par la vaccination.

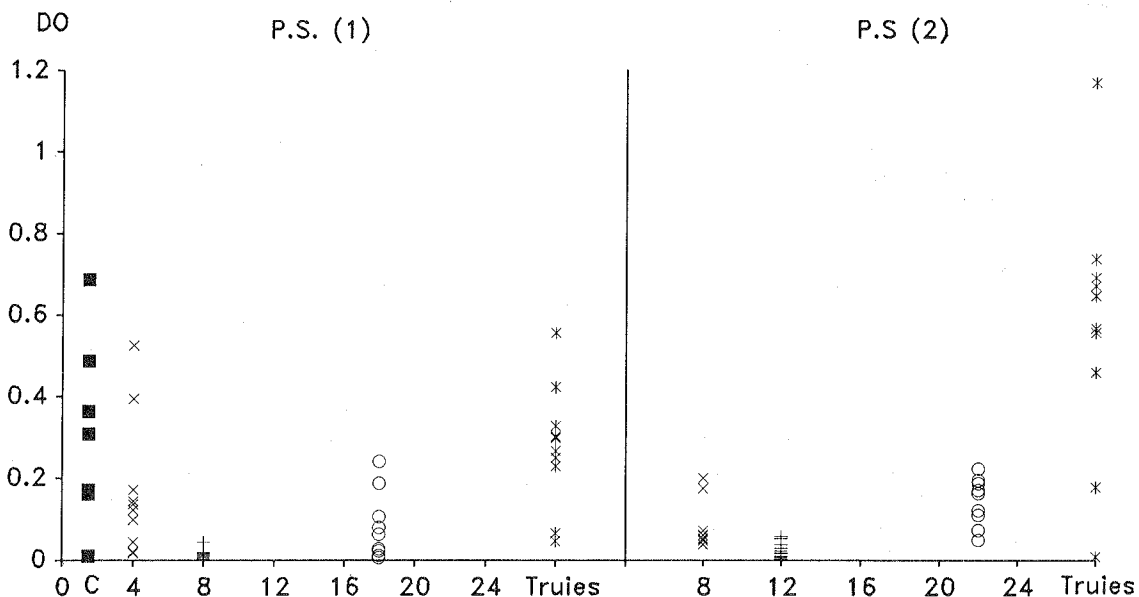
Au cours du premier prélèvement sanguin effectué dans l'élevage 5, les animaux sont séronégatifs dans la majorité des cas (figure 2D). Cet élevage connaît un épisode aigu d'infection à A.p. au moment de la visite et du contrôle à l'abattoir, ce qui se traduit par l'existence chez 18 porcs, de pleuropneumonie associée à des abcès et à des lésions de la plèvre et du péricarde. Le Sérovar 8 est tout d'abord isolé à partir des poumons contrôlés à l'abattoir puis le Sérovar 9 est mis en évidence chez un animal mort. Un autovaccin, préparé à partir du B1S9, est utilisé chez les animaux de 7 semaines, un rappel a lieu 4 semaines plus tard. La figure 2D montre une séroconversion nette chez les porcs ayant subi deux vaccinations. Les truies, qui ne sont pas vaccinées, restent séronégatives. Un second contrôle, réalisé à l'abattoir 3 mois après la vaccination montre une réduction sensible des lésions pulmonaires (de 30 à 5.4 % pour la pleuropneumonie et la pleurésie ; de 20 à 1 % pour la péricardite et de 40 à 12 % pour les abcès). La mortalité est également supprimée.

- Sérovar 2

Les animaux des élevages de sélection sont dépourvus d'anticorps vis-à-vis du Sérovar 2. Les animaux des élevages 2, 3 et 4 sont également séronégatifs.

Les profils sérologiques des élevages 6 et 7 (dans lesquels A.p. Sérovar 2 a été isolé) sont analogues (figure 3). Les porcelets de 4 semaines ont des anticorps d'origine maternelle. Les anticorps ne sont plus détectés à 8 semaines d'âge. Une faible séroconversion est observée chez les porcs de 18 semaines. Les truies sont séropositives. La mise en évi-

FIGURE 3
PROFIL SÉROLOGIQUE DES ÉLEVAGES 6 ET 7 (Ap B1 S2)

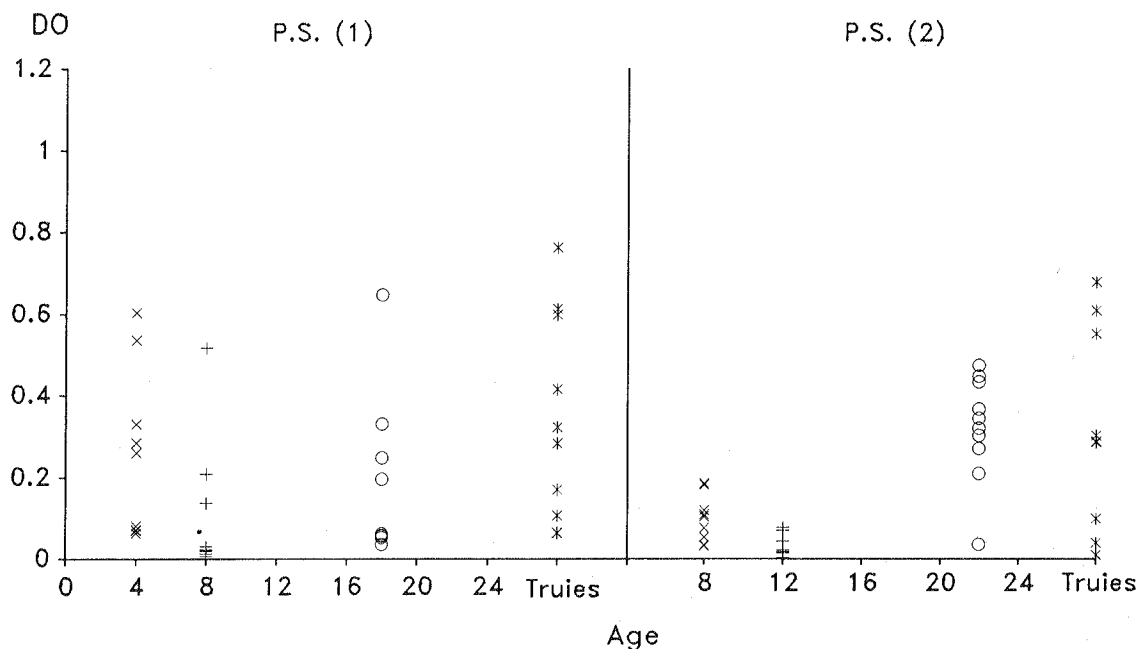


dence des anticorps sériques confirme donc la présence du Sérovar 2 au sein de ces deux élevages.

Les analyses sérologiques révèlent l'existence d'anticorps

chez certains animaux appartenant aux élevages 1 et 5. Les profils de ces deux élevages sont analogues et indiquent donc la présence du Sérovar 2 non détectée par la bactériologie, (figure 4) ou d'éventuelles réactions antigéniques croisées.

FIGURE 4
PROFIL SÉROLOGIQUE DES ÉLEVAGES 1 ET 5 (Ap B1 S2)



DISCUSSION

- *A.p.* (B1S9 ou S2) se montre très pathogène pour le porc, dans les conditions expérimentales. Il provoque la mort des animaux et induit des lésions sévères au niveau des organes respiratoires, de la plèvre ou du péricarde. Chez les animaux infectés avec le Sérovar 9 et qui survivent à l'infection (dans le cas de notre expérience trois animaux traités par une molécule incorporée dans l'aliment), l'ELISA détecte les anticorps sériques entre la première et la seconde semaine après l'infection. Chez ces animaux, les techniques micro-biologiques ne permettent pas d'isoler *A.p.* 3 semaines après l'infection, bien que l'un des porcs soit porteur de lésions caractéristiques de l'infection chronique. Ainsi, l'ELISA permet de détecter des animaux contaminés par *A.p.* en absence de manifestations cliniques.

- *Dans les conditions de la pratique*, les animaux des deux élevages de sélection se révèlent séronégatifs vis-à-vis des Sérovars 2 et 9. Ces résultats confirment l'absence de manifestations cliniques et de lésions pulmonaires chez les animaux issus de ces deux élevages où *A.p.* n'a jamais été isolé. L'ELISA a mis des anticorps en évidence dans 4 élevages au sein desquels *A.p.*, Sérovar 9 a été isolé. De plus, le test a permis de révéler l'infection par ce même Sérovar au sein de l'élevage 7 qui, a priori, n'hébergeait que les Sérovars 2 et 3. Il en est de même pour la détection du Sérovar 2 dans les élevages 1 et 5 (pour lesquels il ne faut pas totalement exclure l'existence de réactions croisées avec d'autres Sérovars). Ces observations sont en accord avec celles d'autres auteurs qui ont montré l'exis-

tence d'infections latentes ou chroniques, diagnostiquées par ELISA (NICOLET et al, 1981 ; MORRISON et al, 1984 ; VAILLANCOURT et al, 1986) ou par d'autres techniques sérologiques (MITUI et al, 1981 ; MITTAL et al, 1984 ; HUNNEMAN and Oving, 1990).

Les truies de ces 5 élevages sont séropositives et les porcelets possèdent des anticorps d'origine maternelle pendant au moins 4 semaines. Ceci montre qu'une protection du porcelet par le colostrum de truies vaccinées est possible ainsi que l'ont montré MACKAY et al, 1988 ; THACKER et MULK, 1988. La séroconversion des porcelets a lieu lorsque les porcs se trouvent dans le local d'engraissement, ce qui signifie que la vaccination du porcelet doit intervenir dans le local de post-sevrage ou au début de l'engraissement. Les résultats obtenus dans les élevages 5 et 6, à l'aide d'autovaccins sont en faveur de ce protocole de vaccination. En effet, le vaccin doit être administré plusieurs semaines avant le contact avec le germe, un rappel de vaccination étant la plupart du temps nécessaire (HIGGINS et al, 1985 ; KUME et NAKAI, 1988 ; INZANA et al, 1988).

De notre étude, nous pouvons conclure que la détection des anticorps sériques permet de confirmer une infection aiguë à *A.p.* (environ deux semaines sont nécessaires à la séroconversion) mais aussi de déceler une infection chronique ou latente. La suppression des séropositifs ou même la suppression de certains troupeaux où la prévalence de l'infection était trop élevée (NICOLET 1986) a été utilisée avec profit dans l'éradication de l'infection mais dans un tel contexte il est nécessaire de tenir compte de certains facteurs liés à l'environnement et aux conditions d'élevages qui influent sur le résultat d'une

manière déterminante. Ainsi, au QUEBEC, si l'éradication du Sérovar 1 d'A.p. a été relativement facile à réaliser, celle du Sérovar 5 semble être plus délicate (LARIVIERE et al, 1990). En effet, selon ces auteurs, de nombreux paramètres sont liés au succès d'un programme d'éradication. Parmi eux, la taille

de l'élevage, la prévalence de l'infection et son taux de transmission, le Sérovar en cause, les infections à Sérovars multiples, la durée de l'élimination des séropositifs, jouent un rôle essentiel. Les travaux doivent donc se poursuivre afin de mieux connaître l'infection à A.p. et ainsi de mieux la contrôler.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GOYETTE G., 1986. Evaluation de l'ELISA pour la sérodétection des porcs exposés à *Haemophilus pleuropneumoniae* M. Sc. thesis, Université de MONTREAL 154 p.
- HIGGINS R., LARIVIERE S., MITTAL K., MARTINEAU G.P., ROUSSEAU P., CAMERON J., 1985. J. Can. Vet. J. 26, 86-89.
- HUNNEMAN W.A. O'VING L., 1990. IPVS Congress LAUSANNE, p. 19.
- INZANA T., M.A.J., WORKMAN T., GOGOLEWSKI ., ANDERSON P., 1988. Inf. Immun. 56 (8) 1880-1889.
- KUME K. NAKAI T., 1988. Japan J. Vet. Sci. 50 (1), 237-241.
- LARIVIERE S., D'ALLAIRE S., DE LASALLE F., NADEAU M., MOORE C., ETHIER R., 1990. IPVS. Congress LAUSANNE p. 17.
- MACKAY D.K.J., BORTHWICK N.J., SMITH I.M., MACKENZIE N.M., 1988. IPVS Congress RIO DE JANEIRO p. 84.
- MATTEWS P.R., PATTISSON I.H., 1961. Comp. Pathol. 71, 44- 52.
- MITTAL K.R., HIGGINGS R., LARIVIERE S., LEBLANC D., 1984. Am. J. Vet. Res. 45, 715-719.
- MITUI T., ONAGA H., NAGASAWA Y., NOMURA Y., KURAMASU S., 1981. Vet Microbiol.6, 339-349
- MORRISON R.B., BAHDAT F., HILLEY H.D., PIJOAN C., HILL H.T., 1984. IPVS Congress GHENT p. 102.
- NICOLET J., KONIG H., 1966. Pathol. Microbiol. 29, 301-306.
- NICOLET J., PAROZ Ph., KRAWINKLER M., BAUMGARTNER A., 1981. Am J. Vet. Res. 42, 2139-2142.
- NICOLET J., 1986. Disease of swine 6th edition (edited by Leman et al). IOWA. State University press.
- NICOLET J., 1987. Rec. Med. Vet. 163 (4), 445-449.
- NIELSEN R., 1986. Acta. Vet. Scand. 27, 49-58.
- POHL S., BERTSCHINGER H.U., FREDERIKSEN W., MANNHEIM W., 1988. Inst. J. Syst. Bact. 33 (3), 510-514.
- SHOPE R.E., 1964. J. Exp. Med. 119, 357-368.
- THACKER B., MULKS M., 1988. IPVS Congress RIO DE JANEIRO, p. 83.
- VAILLANCOURT J., MARTINEAU G.P., LARIVIERE S., MITTAL K., HIGGINS R., 1986. IPVS Congress Barcelone p. 257.