

INFECTIONS EXPÉRIMENTALES DE PORCS AVEC LE VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY : mesure de l'excrétion virale

Elisabeth BOURGUEIL, P. VANNIER.

CNEVA - LCRAP - Station de Pathologie Porcine - BP 53 - 22440 Ploufragan.

Avec la collaboration de E. HUTET, B. BEAUREPAIRE, A.KERANFLECH et R. CARIOLET.

Trois lots de 8 porcs charcutiers ont été expérimentalement infectés avec le virus de la Maladie d'Aujeszky (V.M.A). L'excrétion virale a été quotidiennement mesurée durant les 9 jours suivant l'infection au moyen de 2 techniques : l'écouvillonnage nasal profond et le prélèvement d'air. Il a été montré que le virus aéroporté peut être isolé du premier au sixième jour qui suit l'infection. Les concentrations virales obtenues à partir des écouvillons nasaux sont corrélées ($r=0,83$) à celles évaluées pour l'air de l'animalerie. Les variations importantes observées pour les rendements de récupération virale à partir de l'air dépendent étroitement de la composition du milieu de collecte utilisé. Malgré une moins bonne sensibilité, la pratique du prélèvement d'air en atmosphère confinée reflète mieux le phénomène d'excrétion virale que l'écouvillonnage nasal.

Experimental infection of pigs with Aujeszky's disease virus : measure of viral excretion

Three groups of 8 fattening pigs were experimentally infected with Aujeszky's Disease Virus (A.D.V). Viral excretion was daily measured during the 9 days that followed infection by 2 different ways : deep nasal swabbing and air sampling. It was shown that airborne virus could be recovered from day 1 to day 6 post-infection and that a high correlation rate exists between viral amounts in the air and in deep nasal cavity. Viral titres calculated for air samples varied in function of the composition of the collecting fluid used. Although the air sampling procedure presented a low sensitivity (no infectious viral particle could be isolated from air samples when nasal cavity sheltered 103 TCID₅₀/100 mg of mucus), it can be said that it's a good reflect of viral excretion by infected pigs.

INTRODUCTION

La transmission aérienne de virus pathogènes pour l'homme et l'animal via les aérosols est un concept épidémiologique ancien mais difficile à prouver dans les conditions du terrain.

Chez l'homme, le virus influenza constitue l'exemple le plus connu de diffusion par les airs. Chez l'animal, et notamment chez les espèces d'intérêt zootechnique, les exemples sont plus nombreux. On peut citer le cas de prélèvements nasaux effectués sur des travailleurs en contact avec des porcs infectés par le virus de la Maladie Vésiculeuse et à partir desquels le virus a pu être isolé à des titres de 102,4 TCID₅₀ (SELLERS et HERNIMAN, 1974). Le virus de la Fièvre Apteuse, celui de la Maladie de Marek, de la maladie de Newcastle sont suspectés de diffuser par cette voie (DONALDSON, 1983 ; FALK et HUNT, 1980).

Le vecteur viral, l'aérosol, est de taille et de forme variables, liquide ou solide. Quant à la survie (capacité à se répliquer) et au maintien de l'infectiosité (capacité de déclencher l'infection) des particules virales aéropoortées, elle est étroitement liée à l'action de facteurs climatiques comme l'humidité relative, la température ou le rayonnement (AKERS, 1969 ; DONALDSON et FERRIS, 1976) mais aussi à la nature biochimique des particules virales émises dans l'air. Ainsi les virus enveloppés, riches en lipides, présentent des changements de phase de leur membrane phospholipidique et se dégradent donc lorsqu'ils sont exposés à des humidités relatives moyennes voire élevées (cas du virus Langkat, du Semliki Forest, du virus de la stomatite vésiculeuse, de la vaccine ou de l'influenza). Les virus dépourvus de lipides, comme le virus de la Fièvre Apteuse ou les entérovirus, résistent moins bien à de faibles humidités relatives (COX, 1989).

La connaissance de l'importance de ce mode de propagation pour une famille virale donnée revêt un intérêt particulier lorsque l'on considère les virus soumis à un plan d'éradication, comme c'est le cas en France pour celui de la Maladie d'Aujeszky. Les travaux expérimentaux de DONALDSON et al. en 1983 pour ce virus ont établi les conditions nécessaires à la transmission, à la survie et à la multiplication chez l'hôte sensible du virus aéropoorté.

Sur la base de ces travaux, des infections expérimentales de porcs ont été réalisées et un système de prélèvement d'air mis en place dans le but de quantifier le phénomène d'excrétion virale par des animaux infectés.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux

3 lots de 8 porcs charcutiers, issus d'élevage conventionnel, ayant atteint un poids de 80 à 90 kg, sont répartis par 4 dans 2 flats-decks par animalerie. Chaque bloc de l'animalerie est soumis à un air filtré, en dépression par rapport à l'air extérieur.

La séronégativité de chaque animal vis à vis du V.M.A a été démontrée par séroneutralisation, avant l'introduction des animaux dans les locaux d'expérimentation.

1.2. Épreuve virulente

A l'âge de 18-19 semaines, soit vers un poids moyen de 84 kg,

la souche d'épreuve 75V19 (ayant subi 3 passages en culture cellulaire de rein de porc) a été administrée 3 fois en 24 heures par voies intranasale et orale, à la dose de 105 TCID₅₀/ml, à raison de 1,5 ml de virus dans chaque narine et de 2 ml per os. Le premier jour de l'infection étant J0.

1.3. Mesures de l'excrétion virale

2 techniques ont été utilisées pour évaluer l'excrétion virale par les animaux infectés : l'écouvillonnage nasal et le prélèvement d'air.

1.3.1. écouvillons nasaux

Des écouvillons nasaux profonds (environ 10 cm) ont été quotidiennement réalisés sur l'ensemble des animaux, depuis le premier jour d'épreuve jusqu'au neuvième jour post-infection. Chaque écouvillon est pesé avant et après le prélèvement sur animaux, afin de ramener le titre viral obtenu à un poids standard de 100 mg de mucosité nasale collectée. Aussitôt après le prélèvement, l'écouvillon est placé dans 2 ml de MEM, antibiotosupplémenté (Penicilline 100 UI/ml, Streptomycine 0,1 mg/ml) et additionné d'Amphotéricine B (Fongizone) (125 µg/100 ml). L'écouvillon est conservé à -70°C avant d'être titré en microplaque sur cellules PK. Le titre viral infectieux est déterminé 3 jours p.i et est calculé selon la méthode de KAERBER (1931). Ce titre est exprimé en TCID₅₀/ml, rapporté à 100 mg de mucosités.

1.3.2. prélèvements d'air

- Appareillage :

3 cyclones en inox ont été construits d'après le modèle décrit par ERRINGTON et POWELL (1969). Chaque appareil a été placé au milieu du local, entre les 2 flat-decks, à environ 1 mètre du niveau du sol. La ventilation de la pièce a été maintenue durant la période de prélèvement. Le débit d'air du cyclone a été fixé à 1000 l d'air / min durant 15 minutes. 50 ml de liquide de collecte ont été injectés dans l'appareil à l'aide d'une pompe péristaltique, débitant 2 ml de liquide par minute. Après chaque prélèvement, le montage est entièrement rincé et désinfecté avec une solution d'oxygène actif (SINET) puis rincé à l'eau claire. Lors de chaque prélèvement d'air, des boîtes de Petri contenant 20 ml de chacun des liquides de collecte testés ont été placées au niveau du cyclone et exposées à l'air de l'animalerie durant 1 heure par jour.

- Liquides de collecte :

3 milieux de collecte ont été testés pour leur capacité à collecter les particules virales infectieuses aéropoortées :

- Milieu 1 : P.B.S (pH 7,2) + HEPES (20 mM),
- Milieu 2 : milieu 1 + 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF),
- Milieu 3 : milieu 2 + 0,5% de gélatine.

Chaque milieu a été antibiotosupplémenté en Pénicilline (100 UI/ml), Streptomycine (0,1 mg/ml), Néomycine (50 UI/ml).

- Isolement et titrage viral :

Les prélèvements d'air ont été inoculés sur des tapis confluents de 24 heures de cellules PK-15 établies en monocouche en plaques 6 puits (Falcon). Après 3 jours à 37°C sous

CO₂, les tapis cellulaires sont colorés au violet de méthyle, les effets cytopathiques (ECP) comptés et le nombre d'unités formant des plages (UFP) calculé. Les titres viraux obtenus à partir de l'air (cyclone et boîte de Petri) sont exprimés en log₁₀ du nombre d'UFP/8 porcs/heure. La plupart du temps, les prélèvements sont inoculés aux cellules quelques heures après leur collecte.

Ces résultats sont comparés aux titres viraux obtenus à partir

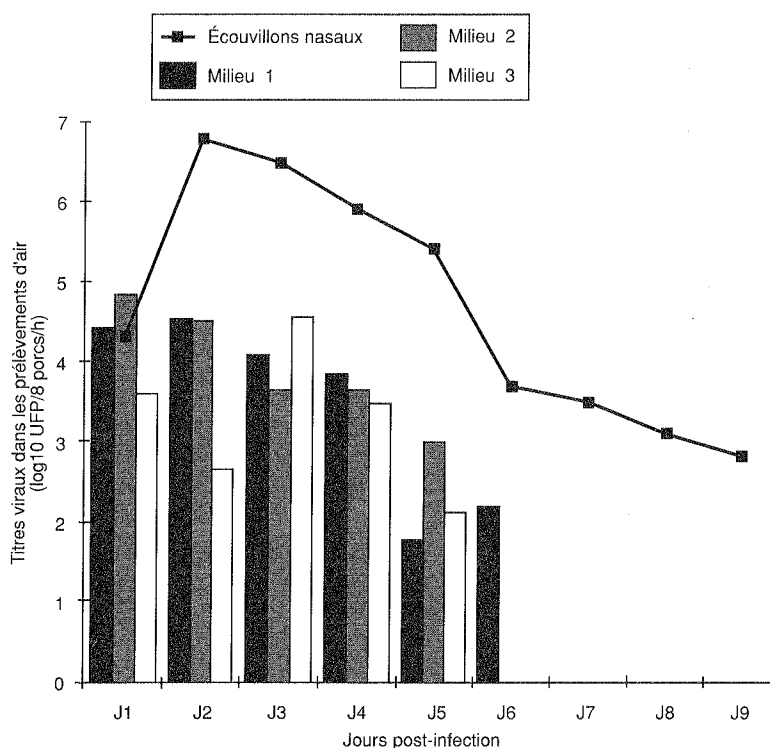
des écouvillons nasaux.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Isolement viral

La comparaison des titres viraux obtenus à partir des prélèvements d'air et des écouvillons nasaux durant les 9 jours p.i est présentée en Figure 1.

FIGURE 1



Il apparaît que du virus infectieux peut-être isolé du premier au sixième jour p.i des échantillons issus du cyclone alors que les écouvillons permettent l'isolement de virus en continu durant les 9 jours qui suivent l'infection.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus à partir des coupelles, présentés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1
TITRES VIRAUX OBTENUS À PARTIR DES COUPELLES
(log₁₀ du nombre d'UFP totales/h)

JOUR post-infection	Milieu 1	Milieu 2
J1	3,34	4,60
J2	3,83	6,97
J3	3,45	6,78
J4	3,22	6,38
J5	2,45	5,59
J6	1,34	4,15
J7	1,52	4,15
J8	0,00	0,00
J9	0,00	0,00

Il ressort que le V.M.A aéroporté peut-être isolé jusqu'à J7 p.i. On constate que l'exposition directe des liquides de collecte à l'air de l'animalerie permet la récupération de particules infectieuses à des concentrations proches de celles obtenues des écouvillons nasaux (jusqu'à 10⁷ TCID₅₀) alors que le cyclone ne restitue qu'un maximum de 10⁵ UFP totales /h. Cette différence de rendement est due principalement au mode de prélèvement : le cyclonage occasionne un «stress» mécanique et physique aux particules aspirées dans l'appareil (désiccation, vitesse d'aspiration et de centrifugation à l'intérieur de l'appareil...) ainsi que des pertes inhérentes à l'appareil par évaporation du liquide et par rétention des particules virales par le matériau de fabrication. Le prélèvement passif par simple sédimentation dans les boîtes de Pétri, beaucoup moins dommageable pour les particules virales, permet une récupération massive.

La différence majeure entre ces 2 modes de prélèvement tient à la taille des particules-vecteurs de virus récupérées. En effet, la technique des coupelles permet la collecte de grosses particules (taille >5µm) qui sédimentent rapidement tandis que le cyclone aspire aussi bien la fraction fine des aérosols (<1µm) que les particules plus larges (WATHES and RANDALL, 1988).

2.2. Comparaison des milieux de collecte

Malgré une bonne corrélation entre les titres viraux issus des

écouvillons et ceux provenant des prélèvements d'air (Tableau 2), l'analyse des résultats montre d'autre part l'hétérogénéité des rendements de collecte en fonction des liquides utilisés.

TABLEAU 2
CORRÉLATIONS ENTRE LES TITRES VIRAUX CALCULÉS
POUR LES ÉCOUVILLONS ET CEUX DES DIFFÉRENTS
MILIEUX DE COLLECTE

milieu 1 / écouvillons :	r = 0,83
milieu 2 / écouvillons :	r = 0,76
milieu 3 / écouvillons :	r = 0,77

L'incorporation de protéines au liquide de collecte s'avère déterminante pour la survie virale. Ainsi, le milieu 1 (témoin) présente la meilleure aptitude à restituer du virus sur une longue période mais uniquement lorsque les prélèvements sont inoculés aux cellules immédiatement après leur collecte. Cela n'est plus vrai lorsque le milieu a subi une congélation-décongélation : la récupération de virus aéroporté avec le cyclone coïncide alors avec les périodes d'excrétion massive, soit de J2 à J5, lorsque les cavités nasales des porcs hébergent 10^6 - 10^7 TCID50/100mg de mucosité.

Les milieux 2 et 3, enrichis respectivement en protéines et en gélatine + protéines, permettent l'obtention de meilleurs rendements de récupération virale pour les mêmes conditions de stockage à -70°C, et ce à de faibles concentrations virales

dans les cavités nasales des porcs (10^3 TCID50/100 mg de mucosité).

CONCLUSION

En définitive, ces résultats concordent avec ceux obtenus par DONALDSON et al. (1983) dans des conditions similaires avec un cyclone en verre. Le virus de la Maladie d'Aujeszky peut-être isolé de l'air d'une animalerie du premier au septième jour après l'épreuve virulente des porcs.

La quantification des particules virales excrétées par les animaux infectés dépend essentiellement de l'effet protecteur du milieu de collecte utilisé pendant le cyclonage, particulièrement dénaturant pour les particules virales (COX, 1989). Une fois émis dans l'air, les virus enveloppés, comme les Herpès, s'avèrent sensibles à l'exposition air/eau. C'est pourquoi l'addition de protéines dans le milieu de collecte diminue l'effet virucide cumulé et du milieu de collecte et de la collecte elle-même. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par STOLZE et KAADEN (1989) pour les Toga- et les Rhabdoviridae.

Cette étude devrait servir de base pour l'évaluation du niveau d'excrétion chez des animaux vaccinés et infectés expérimentalement avec le V.M.A selon le même principe que décrit ci-dessus. D'autre part, il sera intéressant de mesurer la taille des particules ainsi captées par les appareils.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKERS T.G, 1969.in : «An introduction to experimental aerobiology» 296-339, DIMMICK R.L, AKERS A.B (eds) (NEW-York : Wiley-Interscience)
- COX C.S, 1989. Sci. Prog. Oxf 73:469-500.
- DONALDSON A.I., FERRIS N.P, 1976 Vet. Microbiol 1:413-420.
- DONALDSON A.I., 1983. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 302: 529-534
- DONALDSON A.I., WARDLEY R.C, MARTIN S., FERRIS N.P, 1983. Vet. Record 113:490-494.
- ERRINGTON F.P., POWELL E.O, 1969. J. Hyg. Camb. 67: 387-399.
- FALK jr L.A., HUNT R.D, 1980. Ann. New-York Acad. Sci 353:174-178.
- KAERBER G., 1931. Arch.exp.Pathol. Pharmakol. 162:480.
- SELLERS R.F., HERNIMAN K.A.J, 1974. J. Hyg. Camb. 72: 61-65.
- STOLZE B., KAADEN O.R, 1989. J.Vet.Med. B 36:161-167
- WATHES C.M., RANDALL J.M, 1988. in «Aerosol sampling in animal houses» Report EUR 11877 EN (Comission of the European Communities) Bristol 26-28 july.