

## Les infections à *Streptococcus suis* chez le porc : intérêts pratiques des méthodes moléculaires de détection et de typage

Corinne MAROIS (1), Laëtitia LE DEVENDEC (1), Marcelo GOTTSCHALK (2), Marylène KOBISCH (1)

(1) Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Unité de Mycoplasmologie-Bactériologie, BP53, 22440 Ploufragan, France

(2) Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec, Canada, J2S7C6

### Les infections à *Streptococcus suis* chez le porc: intérêts pratiques des méthodes moléculaires de détection et de typage

*Streptococcus suis* est un pathogène important du porc, responsable de pathologies sévères : méningite, polysérosite, septicémie, mortalité brutale. Récemment, trois méthodes moléculaires ont été développées, une PCR multiplexe détectant à la fois l'espèce *S. suis* et les sérotypes 2 et 1/2 et deux techniques de typage moléculaire, l'électrophorèse en champs pulsés et la PCR-Ribotypage. Dans l'étude présentée, ces tests ont été appliqués, au cours d'une étude épidémiologique réalisée dans 8 élevages, épidémiologiquement liés et contaminés par *S. suis* sérotype 2, pour analyser des prélèvements d'amygdales de porcs cliniquement sains (jouant un rôle essentiel dans la transmission de la bactérie) et pour typer les isolats de *S. suis*. Dans tous les élevages, 81,7 % à 95 % des porcs hébergeaient *S. suis* au niveau des amygdales. Le sérotypage a montré que 49,7 % des souches étaient non typables et que 17 sérotypes différents étaient présents. Dans les 7 élevages ayant un historique d'infection à *S. suis*, les sérotypes 2 ou 1/2 ont été détectés dans moins de 5 % des amygdales. Dans le huitième élevage, hébergeant des porcs malades le jour du prélèvement, 40 % des animaux contrôlés en fin d'engraissement étaient porteurs, sans symptômes, de *S. suis* sérotype 2. Le typage moléculaire a mis en évidence l'existence de plusieurs origines de contaminations puisque 10 profils moléculaires différents de *S. suis* sérotype 2 ont été mis en évidence. Ces techniques peuvent être utilisées, avec confiance, lors d'études de transmission de *S. suis* et peuvent contribuer au contrôle de l'infection.

### ***Streptococcus suis* infection in pig: use of molecular typing and detection methods.**

*Streptococcus suis* is an important pathogen of swine, causing meningitis, arthritis, polyserositis, septicemia and sudden death of weaning piglets as well as growing pigs. Recently, three molecular tests were developed, a multiplex PCR assay for the detection of *S. suis* species and serotypes 2 and 1/2, and two molecular typing methods, a pulsed field gel electrophoresis and a PCR-Ribotyping. In the present study, these tests were applied during epidemiological investigations in eight farms, contaminated with *S. suis* serotype 2 and epidemiologically related, to analyse tonsil samples of clinically healthy pigs and to distinguish individual isolates of *S. suis*. In all farms, 81,7 % to 95 % of the pigs were contaminated by *S. suis*. The capsular typing shown that 49.7 % of the strains had a serotype different from serotypes 1, 2, 1/2, 3 to 34. In total, 17 serotypes were present. In seven farms (having known some *S. suis* septicemia before the investigation), *S. suis* serotype 2 or 1/2 was detected in less than 5 % of pigs. In the eighth farm, with pigs suffering of septicemia the day of investigation, 40% of fattening pigs (21 weeks of age), without any symptoms, carried *S. suis* serotype 2 or 1/2 in tonsils. The molecular typing of the strains serotype 2 shown that there are several origins of contaminations since 10 different patterns were detected. These methods can be applicable for transmission studies of *S. suis* with confidence and can contribute to control *S. suis* infection.

## INTRODUCTION

Les infections à *Streptococcus suis* sont très répandues dans les élevages porcins et les pertes économiques engendrées sont considérables mais en France, aucune estimation globale n'est disponible. En revanche, aux Etats-Unis, le coût annuel de l'infection à *S. suis* s'élève à 300 millions de dollars pour la filière porcine (STAATS et al, 1997). *S. suis* est également un agent de zoonose, responsable de méningite et de septicémie chez l'homme (BENSAID et al, 2003, KOPIC et al, 2003 ; PEDROLI et al, 2003).

Actuellement, 35 sérotypes de *S. suis* sont décrits (sérotypes 1 à 34 et le sérotype 1/2) (STAATS et al, 1997). Tous les sérotypes ne sont pas responsables de pathologie grave (méningite, septicémie) et le pouvoir pathogène peut varier au sein d'un même sérotype. Le sérotype le plus fréquemment associé à une pathologie est le sérotype 2 mais les sérotypes 1, 1/2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 22, 23, 27, 28, 30 et 34 sont également mis en cause (HIGGINS et GOTTSCHALK, 1999). En France, le sérotype 2 est souvent isolé de cas cliniques, suivi des sérotypes 1/2, 9, 7 et 3 (BERTHELOT-HÉRAULT et al, 2000). Les porcs peuvent également héberger la bactérie en absence de symptômes. *S. suis* est alors principalement localisé dans les cavités nasales et les amygdales (MWANIKI et al, 1994). Ce portage asymptomatique n'est affecté ni par la présence d'anticorps ni par l'administration d'antibiotiques et il concerne tous les sérotypes y compris le sérotype 2. Les porteurs asymptomatiques peuvent déclarer la maladie dans certaines circonstances (conditions d'élevage défavorables, mouvement des animaux, stress, environnement inadapté, etc...) et contaminer leurs congénères (HIGGINS et GOTTSCHALK, 1999 ; GOTTSCHALK et al, 2001).

Afin de détecter les animaux porteurs asymptomatiques, qui ont un rôle essentiel dans la transmission de la bactérie, l'utilisation des techniques dérivées de la biologie moléculaire est indispensable. En effet, les prélèvements réalisés sur des animaux vivants (écouvillonnage nasal, biopsie d'amygdale...) étant polyinfectés, l'isolement de *S. suis* est complexe et les chances d'isoler la bactérie sont faibles. Plusieurs PCR Monoplexes ou Multiplexes, permettant de détecter *S. suis* et plus particulièrement quelques sérotypes (2 et 1/2, 1 et 14, 9, et 7), ont été récemment développées (WISSELINK et al, 2002 ; OKWUMABUA et al, 2003 ; MAROIS et al, 2004a). D'autres méthodes moléculaires peuvent également être utilisées pour comparer des isolats de *S. suis* appartenant à un même sérotype. Ces outils peuvent permettre d'établir l'origine de l'infection dans un élevage ou d'étudier la cinétique de l'infection lors d'un épisode clinique. Différentes techniques ont été développées : le ribotypage (RASMUSSEN et al, 1999), l'amplification génique arbitraire (RAPD : Random Amplified Polymorphism DNA) (MARTINEZ et al, 2002 ; CLOUTIER et al, 2003) et l'électrophorèse en champs pulsés (PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis) (ALLGAIER et al, 2001 ; BERTHELOT-HÉRAULT et al, 2002). Parmi ces méthodes, la PFGE a été décrite comme étant la plus discriminante et la plus reproductible. Cependant, le temps nécessaire à l'analyse est long et cette technique nécessite un appareillage coûteux uniquement présent dans certains laboratoires. Très récemment, une nouvelle approche a été envisagée dans notre laboratoire : la caractérisation des régions intergéné-

riques (RI) présentes entre les gènes codant pour l'ARN 16S et 23S ou « PCR-Ribotypage » (MAROIS et al, 2004b).

L'objectif de la présente étude est de montrer l'intérêt des techniques dérivées de la biologie moléculaire lors de suivis épidémiologiques des infections à *S. suis*. Cette démonstration est réalisée à travers une étude en élevage porcine. Les trois techniques utilisées sont une PCR multiplexe permettant de détecter à la fois l'espèce *S. suis* et les sérotypes 2 ou 1/2, la PFGE et la PCR-Ribotypage.

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. PCR multiplexe

La PCR multiplexe utilisée permet de détecter à la fois l'espèce *S. suis* et les sérotypes 2 et 1/2 à partir de prélèvements biologiques (écouvillonnage et/ou biopsie d'amygdale) réalisés chez le porc vivant. Elle est basée sur l'amplification d'un fragment de 294 pb codant pour l'ARNr 16 S de *S. suis* et d'un fragment de 459 pb codant pour la capsule de *S. suis* sérotypes 2 et 1/2. Un contrôle interne (CI) a également été inclus afin d'éviter les résultats faussement négatifs induits par des inhibiteurs de PCR éventuellement présents dans les échantillons. La spécificité de la technique ainsi que sa sensibilité ont été évaluées. Dans les conditions utilisées, la sensibilité du test est de 28 UFC/mL alors que celle de la bactériologie classique est de 500 UFC/mL. Les caractéristiques du test et la présence d'un CI permettent d'analyser directement le prélèvement, sans étape de culture. La PCR a été validée avec des souches de *S. suis* d'origine porcine ou humaine. De plus, la technique a été utilisée chez des animaux infectés expérimentalement (MAROIS et al, 2004a).

### 1.2. Typage moléculaire : PFGE et PCR-Ribotypage

Le typage moléculaire des souches de *S. suis* a été réalisé par PFGE en utilisant la technique décrite par BERTHELOT-HÉRAULT et al (2002), et par PCR-Ribotypage (MAROIS et al, 2004b). Cette dernière méthode permet un typage moléculaire qui consiste à amplifier les RI présentes entre les gènes codant pour l'ARN 16S et 23S de *S. suis* et à effectuer une restriction enzymatique du produit amplifié à l'aide des enzymes *RsaI* ou *MbolI*. Cette technique est discriminante ( $D > 0,95$ ), reproductible, rapide et simple. L'application de la PCR-Ribotypage au typage de 138 souches de *S. suis*, non reliées épidémiologiquement, a permis d'étudier les relations phylogénétiques entre des souches isolées de cas pathologiques chez l'Homme ou chez le porc et des souches isolées de porcs cliniquement sains (MAROIS et al, 2004b).

Brièvement, le mélange réactionnel de la PCR-Ribotypage contient du tampon (Tris-HCl 67 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  16 mM, Tween 20 0,01%,  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM [pH 8,8]), 1,5 mM de chacun des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), 400 nM de chaque amorce 16S-489(s) (5'-TTC TCACTTGACGGTATCTTAC-3') et 23S-206(as) (5'-gggtaccta-gatgtttcagttc-3'), 2 unités de Taq polymérase (Eurobio), et 5  $\mu\text{L}$  de matrice d'ADN. La réaction d'amplification comporte 40 cycles comprenant chacun une dénaturation de 30 s à 94°C,

une hybridation de 30 s à 60°C et une élongation de 5 min à 72°C, enfin une élongation finale 5 min à 72°C. Les produits amplifiés (15 µL) sont ensuite digérés avec 1 unité d'enzyme (RsaI ou MbolI) pendant 3h à 37°C. Les produits digérés par RsaI sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à faible point de fusion à 2,5 % et la migration est réalisée dans du tampon TBE (Tris 90 mM, Acide borique 90 mM, EDTA 2,5 mM pH8) pendant 2,5 h à 125 V. Les produits digérés par MbolI sont séparés dans un gel d'agarose «standard» dans du tampon TBE pendant 2 h à 125 V. Les gels sont colorés dans une solution de Bromure d'éthidium à 0,1 µg/ml pendant 1 heure puis les profils sont visualisés sur table UV et photographiés à l'aide d'une caméra vidéo « Vilber Lourmat » et analysés à l'aide du logiciel Biogène (BERTHELOT-HÉRAULT et al, 2002). Le marqueur de tailles moléculaires est le « Ladder 50pb Pharmacia ».

### 1.3. Protocole d'échantillonnage en élevage

Huit élevages porcins, affiliés à la même organisation économique de producteurs donc épidémiologiquement liés, ont fait l'objet de cette étude : 7 élevages ayant connu des manifestations épisodiques de l'infection à *S. suis* au cours des 6 mois précédant l'étude (élevages 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8) et un élevage dont les animaux manifestaient cliniquement la maladie (élevage 5). Les pourcentages de pertes imputés à *S. suis* étaient compris entre 1,5 et 7 %, selon les élevages. Dans chacun de ces élevages, des écouvillonnages et des biopsies d'amygdales ont été réalisés chez 60 animaux ne présentant pas de signes cliniques : 15 truies gestantes (5 truies de rang de portée 1-2, 5 truies de rang de portée 3-4 et 5 truies de plus de 5 portées), 15 porcs en post-sevrage (PS) et 30 porcs en engraissement (15 en début d'engraissement à environ 15 semaines d'âge (DE) et 15 en fin d'engraissement à environ 21 semaines d'âge (FE)). Dans l'élevage 5, le diagnostic de l'infection à *S. suis* sérotype 2 a été confirmé à partir du sang d'animaux morts brutalement. Des prélèvements environnementaux ont également été réalisés dans les locaux «gestante», «post sevrage» et «engraissement» [fèces, aliment et/ou eau de boisson, mouches et poussière (chiffonnettes) sur le matériel de ventilation et d'élevage et sur les vêtements du préleveur].

Au total, 1440 prélèvements effectués chez les animaux et 354 prélèvements environnementaux ont été analysés par PCR multiplexe et bactériologie. Les souches de *S. suis* isolées, appartenant au sérotype 2 ou 1/2, ont été comparées par PFGE et PCR-Ribotypage.

### 1.4. Analyse statistique

Les résultats de laboratoire obtenus dans chaque élevage ont été comparés à l'aide du test du Chi<sub>2</sub> (n>5) et du test exact de Fisher (n ≤ 5). Les différences ont été estimées significatives lorsque p < 0,05.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Taux de portage de *S. suis*

Les taux de portage de *S. suis*, obtenu par PCR et par bactériologie sont présentés dans la figure 1. Au total, dans les

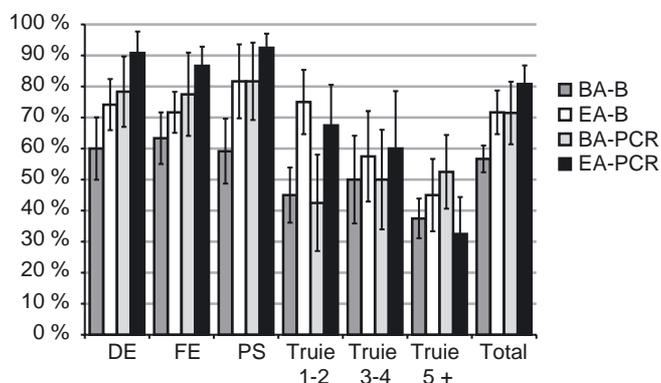
8 élevages, 57 % des biopsies d'amygdales et 72 % des écouvillonnages d'amygdales étaient positifs par bactériologie. D'autre part, 71 % des biopsies d'amygdales et 81 % des écouvillonnages d'amygdales étaient positifs par PCR multiplexe. Les analyses statistiques, ont montré que la différence entre les résultats donnés par la PCR et par la bactériologie était significative (p < 0,05). De plus, les résultats obtenus à partir des différents types de prélèvements réalisés au niveau des amygdales (biopsie et écouvillonnage) étaient significativement différents (p < 0,05). Selon les élevages, 81,7 % à 95 % des porcs étaient porteurs de *S. suis*. Les truies les plus âgées (truie 5+) hébergeaient significativement moins la bactérie que les porcs appartenant aux autres groupes (PS, DE, FE) (p < 0,05).

Parmi les isolats, 49,7% étaient non sérotypables. Les autres souches appartenaient aux sérotypes 2, 1/2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 16, 18, 22, 27, 28, 29, 30, 31 et 34. Le sérotype 22 était le plus détecté (12 %) suivi des sérotypes 5 (2,9 %), 11 (2,7 %) et 2 (2,3 %).

### 2.2. Taux de portage de *S. suis* sérotype 2 ou 1/2

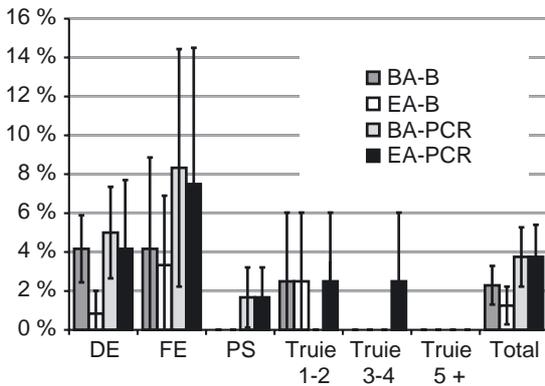
Les taux de portage de *S. suis* sérotype 2 ou 1/2, déterminés par PCR et bactériologie, à partir des prélèvements d'amygdales réalisés sur les porcs situés dans les locaux « gestante », « post-sevrage » et « engraissement » des 8 élevages, sont rapportés dans la figure 2. Au total, dans les 8 élevages, 2,3 % des biopsies d'amygdales et 1,25 % des écouvillonnages d'amygdales étaient positifs par bactériologie. De plus, 3,75 % des biopsies d'amygdales et 3,75 % des écouvillonnages d'amygdales étaient positifs par PCR multiplexe. Les analyses statistiques ont montré d'une part que la différence entre les résultats donnés par la PCR et la bactériologie était significative (p < 0,05) et d'autre part que les résultats obtenus à partir des différents types de prélèvements (biopsies et écouvillonnages d'amygdales)

**Figure 1** - Pourcentage de porcs (des 8 élevages) porteurs de *S. suis* au niveau des amygdales, en fonction de l'âge



DE : Début d'engraissement ; FE : Fin d'engraissement ; PS : Post-sevrage ; Truie 1-2 : truie de rang de portée 1-2 ; Truie 3-4 : truie de rang de portée 3-4 ; Truie 5+ : truie de plus de 5 portées ; BA-B : Biopsies d'amygdales analysées par Bactériologie ; EA-B : Ecouvillonnages d'amygdales analysées par Bactériologie ; BA-PCR : Biopsies d'amygdales analysées par PCR multiplexe ; EA-PCR : Ecouvillonnages d'amygdales analysés par PCR multiplexe.

**Figure 2** - Pourcentage de porcs (des 8 élevages) porteurs de *S. suis* sérotype 2 ou 1/2 au niveau des amygdales, en fonction de l'âge



DE : Début d'engraissement ; FE : Fin d'engraissement ; PS : Post-sevrage ; Truie 1-2 : truie de rang de portée 1-2 ; Truie 3-4 : truie de rang de portée 3-4 ; Truie 5+ : truie de plus de 5 portées ; BA-B : Biopsies d'amygdales analysées par Bactériologie ; EA-B : Ecouvillonnages d'amygdales analysées par Bactériologie ; BA-PCR : Biopsies d'amygdales analysées par PCR multiplexe ; EA-PCR : Ecouvillonnages d'amygdales analysés par PCR multiplexe.

n'étaient pas significativement différents ( $p > 0,05$ ). Ces analyses ont également montré que les truies, quel que soit le rang de portée, étaient significativement moins infectées par *S. suis* sérotype 2 ou 1/2 que les porcs plus jeunes (PS, DE, FE) ( $p < 0,05$ ). De plus, les porcs en fin d'engraissement hébergeaient significativement plus de *S. suis* sérotype 2 ou 1/2 que les porcs en post-sevrage ( $p < 0,05$ ).

Dans les 7 élevages ayant connu antérieurement un épisode d'infection, *S. suis* (sérotype 2 ou 1/2) a été détecté dans moins de 5 % des amygdales. Dans le huitième élevage, hébergeant des porcs malades le jour du prélèvement (élevage 5), le taux de portage a atteint 40 % des animaux contrôlés en fin d'engraissement (21 semaines d'âge).

### 2.3. Détection de *S. suis* dans les prélèvements environnementaux

L'analyse, par bactériologie et PCR multiplexe, des prélèvements environnementaux réalisés dans les 8 élevages n'a pas permis de révéler la présence de *S. suis* sérotypes 2 et 1/2.

*S. suis* a été isolé dans le local « post-sevrage » de l'élevage 1 dans 2 prélèvements d'eau de boisson. Toutes les autres

**Tableau 1** - Résultats d'analyse des prélèvements environnementaux réalisés dans les 8 élevages

	Local <sup>(1)</sup>	n <sup>(2)</sup>	PCR <sup>(3)</sup>	Type de prélèvements
élevage 1	G	12	0	eau de boisson (2)
	PS	15	2	
	E	17	0	
	total	44	2	
élevage 2	G	16	2	auges (2) aliment (1), eau de boisson (2), fèces (1), poussière (1), auges (2) auges (2)
	PS	19	7	
	E	18	2	
	total	53	11	
élevage 3	G	12	3	poussière (1), auges (2) aliment (2), fèces (1), auges (2) auge (1)
	PS	12	5	
	E	18	1	
	total	42	9	
élevage 4	G	12	2	aliment (2) eau de boisson (1) aliment (1), litière (2), poussière (1), vêtements du préleveur (1)
	PS	19	1	
	E	13	5	
	total	44	8	
élevage 5	G	16	6	aliment (1), auges (2), mouches (3) eau de boisson (3), poussière (3), auges (2)
	PS	15	8	
	E	14	0	
	total	45	14	
élevage 6	G	12	6	aliment (2), fèces (1), auges (2), dos "cochette" (1) eau de boisson (3)
	PS	12	0	
	E	21	3	
	total	45	9	
élevage 7	G	12	0	aliment (1)
	PS	13	1	
	E	15	0	
	total	40	1	
élevage 8	G	14	4	aliment (1), auges (3)
	PS	13	0	
	E	14	0	
	total	41	4	
<b>Total</b>		<b>354</b>	<b>58</b>	

<sup>(1)</sup> G : Gestante ; PS : Post-sevrage ; E : Engraissement <sup>(2)</sup> Nombre de prélèvements

<sup>(3)</sup> Nombre de prélèvements positifs *S. suis* par PCR multiplexe

analyses bactériologiques étaient négatives. Ces deux isolats étaient non sérotypables et présentaient des profils de galerie Api 20 Strep identiques, singuliers et non interprétables. Le séquençage de leurs ADNr 16S a permis de confirmer leur appartenance à l'espèce *S. suis* (99 % d'identité).

Les résultats obtenus par PCR multiplexe sont décrits dans le tableau 1. Dans chaque élevage, un prélèvement environnemental, au moins, renfermait de l'ADN de *S. suis*. Au total, 58 prélèvements (sur 354) étaient positifs. De l'ADN de *S. suis* a été détecté dans l'aliment, l'eau de boisson, les fèces, la litière, la poussière collectée sur le dos d'une cochette, sur les auges et sur les vêtements du préleveur. Quelques mouches capturées dans l'élevage 5 étaient également positives. L'environnement de l'élevage 5 (hébergeant des porcs malades le jour du prélèvement) était le plus

contaminé par *S. suis*. Les résultats PCR obtenus dans cet élevage sont statistiquement différents des résultats obtenus dans les élevages 1, 7, 8 ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4. Comparaison des souches isolées d'amygdales et de cas cliniques, par PFGE et PCR-Ribotypage

Dans les huit élevages suivis, 37 isolats, appartenant au sérotype 2 ou 1/2, ont été typés par PFGE (avec l'enzyme *SmaI*) et PCR-Ribotypage avec les enzymes *RsaI* et *MbolI*. Parmi ces isolats, 16 provenaient d'amygdales, 2 de prélèvements environnementaux. De plus, 19 souches, isolées à partir du sang d'animaux malades avant le début de l'étude, ont été analysées. Parmi ces 19 souches, 7 ont été utilisées pour produire des autovaccins. Les résultats sont rapportés

**Tableau 2** - Résultats du typage moléculaire des 34 souches de sérotypes 2 et 1/2 isolées des 8 élevages

N° élevage	N° souche	N° profil			profil combiné	sérotype	origine	diagnostic /autovaccin	année
		PFGE	RsaI	MbolI					
élevage 1	347	P3	R31	M15	C2	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	348	P3	R31	M15	C2	1/2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	349	P3	R31	M15	C2	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	350	P3	R31	M15	C2	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	351	P5	R43	M6	C3	NT	environnement	diagnostic	2003
	352	P5	R43	M6	C3	NT	environnement	diagnostic	2003
élevage 2	353	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	1/2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
élevage 3	311	P2	R27	M10	C4	2	septicémie	diagnostic	2003
	330	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	diagnostic	2003
	336	<b>P1</b>	R28	<b>M8</b>	C5	2	septicémie	diagnostic	2003
	337	<b>P1</b>	<b>R24</b>	M7	C6	2	septicémie	diagnostic	2003
	338	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	diagnostic	2003
	340	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	<b>autovaccin</b>	2003
	341	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	<b>autovaccin</b>	2003
	354	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
élevage 4	355	<b>P1</b>	R10	<b>M8</b>	C7	1/2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
élevage 5	289	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	diagnostic	1996
	326	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	diagnostic	2003
	331	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	diagnostic	2003
	332	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	diagnostic	2003
	342	P1	R38	M10	C8	2	septicémie	<b>autovaccin</b>	2003
	356	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	357	<b>P1</b>	R5	<b>M8</b>	C9	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	358	<b>P1</b>	R16	<b>M8</b>	C10	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	359	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	360	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	361	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	362	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
élevage 6	320	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	diagnostic	2003
	345	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	<b>autovaccin</b>	2003
élevage 7	288	P2	R38	M10	C11	2	septicémie	diagnostic	1997
	343	P2	R10	M11	C12	2	septicémie	<b>autovaccin</b>	2003
	344	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	<b>autovaccin</b>	2003
	363	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
	365	<b>P14</b>	R26	M6	C13	5	<b>amygdale</b>	diagnostic	2003
élevage 8	297	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	diagnostic	2000
	346	<b>P1</b>	<b>R24</b>	<b>M8</b>	<b>C1</b>	2	septicémie	<b>autovaccin</b>	2003

dans le tableau 2. Les trois techniques de typage semblent complémentaires. Afin d'augmenter le pouvoir discriminant, il a été décidé d'attribuer à chaque isolat un numéro de profil « combiné ». Treize profils différents ont ainsi pu être définis dans les 8 élevages (C1 à C13). Dix profils différents ont été mis en évidence parmi les isolats appartenant au sérotype 2. Le profil le plus commun est le C1. Il a été détecté dans 6 élevages (2, 3, 5, 6, 7 et 8). Au total, 21 isolats avaient ce profil (soit 57 %). Ce profil a été retrouvé chez des souches de sérotype 2 isolées de septicémie (13/37), d'amygdales (8/37) et chez une souche de sérotype 1/2. Les deux souches de *S. suis* non sérotypables, isolées dans des prélèvements environnementaux, présentaient des profils identiques et singuliers (C3). Deux souches utilisées pour produire des autovaccins dans les élevages 5 et 7 ne présentaient pas le profil C1.

### 3. DISCUSSION-CONCLUSION

L'utilisation des techniques dérivées de la biologie moléculaire est indispensable pour détecter les animaux porteurs asymptomatiques qui jouent un rôle essentiel dans l'épidémiologie des infections à *S. suis*. Lors de cette étude, réalisée dans 8 élevages porcins, la PCR multiplexe s'est révélée plus sensible que la bactériologie. La PCR facilite considérablement la recherche de *S. suis* dans des prélèvements polyinfestés comme ceux effectués au niveau des amygdales. Dans le cas où l'isolement de la souche est nécessaire (antibiogramme, autovaccin...), seuls les prélèvements positifs par PCR font alors l'objet d'analyse bactériologique. De plus, la PCR peut également être utile pour identifier des colonies suspectes. La grande sensibilité et la spécificité de ce test, ainsi que la présence d'un contrôle interne permettent d'analyser directement le prélèvement, sans étape de culture.

Cette technique a également été utilisée lors d'une infection expérimentale. Elle a permis de montrer que l'écouvillonnage d'amygdales est plus adapté que la biopsie pour détecter les animaux porteurs de *S. suis*. Ce prélèvement est moins traumatisant pour l'animal et plus aisé à réaliser. Un résultat identique a été obtenu en élevage. Cette expérience a également montré que des animaux peu infectés (présentant peu de symptômes) peuvent néanmoins contaminer leurs congénères. Ce type de transmission était soit directe soit indirecte (MAROIS et al, 2004a).

Dans les 8 élevages, 81,7 % à 95 % des porcs hébergeaient *S. suis* au niveau des amygdales. La sérotypie a montré que près de la moitié des souches étaient non typables et que 17 sérotypes différents étaient présents. Dans les élevages suivis, le sérotype impliqué dans les cas pathologiques est le sérotype 2. Cependant, ainsi que l'indiquent GOTTSCHALK et al (2001), d'autres sérotypes peuvent être à l'origine d'infection grave.

Dans les 7 élevages ayant un historique d'infection à *S. suis*, les sérotypes 2 ou 1/2 ont été détectés dans moins de 5% des amygdales. Ceci signifie que le nombre de prélèvements effectués aurait dû être supérieur. A titre indicatif, dans un

cheptel de 250 animaux il aurait fallu prélever 167 animaux pour un taux de portage de 1 % (TOMA et al, 2001). Dans le huitième élevage, hébergeant des porcs malades le jour du prélèvement, le taux de portage a atteint 40 % des animaux contrôlés en fin d'engraissement (21 semaines d'âge).

Dans le cadre de l'étude, pour les 8 élevages, la maladie s'exprime en engraissement, cependant la présence de *S. suis* sérotype 2 ou 1/2 est détectée dès le Post-Sevrage dans 4 des 8 élevages. Ceci permet de penser que ce sont les truies qui, au sein d'un élevage, constituent le réservoir de *S. suis*. Cette hypothèse a été vérifiée dans 2 élevages où quelques truies gestantes hébergeaient *S. suis* sérotype 2 ou 1/2 au niveau des amygdales. L'existence de cette transmission de la truie vers le porcelet par un portage au niveau de l'appareil respiratoire ou au niveau vaginal chez les truies a déjà été décrite (HIGGINS et GOTTSCHALK, 1999 ; STAATS et al, 1997 ; AMASS et al, 1997 ; CLOUTIER et al, 2003).

Différents sérotypes de *S. suis* (à l'exception du sérotype 2 ou 1/2) ont été détectés dans l'environnement immédiat des animaux (58/354). Ceci confirme l'importance de la qualité de la désinfection des locaux, du matériel... Lors d'études précédentes, il a été montré que *S. suis* sérotype 2 pouvait être transmis par des porcs infectés à des porcs sains, en contact direct ou indirect (STAATS et al, 1997 ; HIGGINS et GOTTSCHALK, 1999 ; BERTHELOT-HÉRAULT et al, 2001).

Le typage moléculaire, par PFGE et PCR-Ribotypage, des 37 souches de *S. suis* a mis en évidence un profil majoritaire (C1), présent dans 6 élevages, ce qui suppose une origine de contamination commune. Le typage moléculaire supplémentaire de 17 souches, isolées dans 13 élevages de production épidémiologiquement liés aux précédents, a également permis de détecter ce profil C1. L'existence d'une transmission verticale (de la multiplication vers la production) peut alors être imaginée. Cependant, l'origine de la contamination est vraisemblablement multifactorielle (statut sanitaire des animaux, environnement : ventilation, présence d'autres espèces animales dans l'élevage...) puisqu'au sein des isolats de sérotype 2, dix profils différents ont été mis en évidence (STAATS et al, 1997). Dans ce contexte, l'intérêt d'un autovaccin commun, préparé avec la souche présentant le profil C1, est discutable. Un tel autovaccin pourrait se révéler inefficace. A titre d'exemple, dans les élevages 5 et 7, les deux souches isolées de porcs malades sont différentes de la souche utilisée dans la production de l'autovaccin. Ceci pourrait expliquer les échecs de vaccination.

En conclusion, la PCR multiplexe, la PFGE et la PCR-Ribotypage sont trois techniques utiles dans les études épidémiologiques et le contrôle de l'infection à *S. suis* dans les élevages.

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Thierry Ogel, les éleveurs et les organisations de production qui ont accepté de contribuer activement à ce travail.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLGAIER A., GOETHE R., WISSELINK H.J., SMITH H.E., VALENTIN-WEIGAND P., 2001. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 445-453.
- AMASS S.F., SANMIGUEL P., CLARK L.K., 1997. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1595-1596.
- BENSALD T., BONNEFOI-KYRIACOU B., DUPEL-POTTIER C., BELLON O., LAGIER E., CHARDON H., 2003. *Presse Med.* 32, 1077-1078.
- BERTHELOT-HÉRAULT F., MORVAN H., KÉRIBIN A.M., GOTTSCHALK M., M. KOBISCH., 2000. *Vet. Res.*, 31, 473-479.
- BERTHELOT-HÉRAULT F., GOTTSCHALK M., LABBE A., CARIOLET R., KOBISCH M., 2001. *Vet. Microbiol.*, 82, 69-80.
- BERTHELOT-HÉRAULT F., MAROIS C., GOTTSCHALK M., KOBISCH M., 2002. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 615-619.
- CLOUTIER G., D'ALLAIRE S., MARTINEZ G., SURPRENANT C., LACOUTURE S., GOTTSCHALK M., 2003. *Vet. Microbiol.*, 97, 135-151.
- GOTTSCHALK M., KOBISCH M., BERTHELOT-HÉRAULT F., 2001. *Journées Rech. Porcine en France*, 33, 269-276.
- HIGGINS R., GOTTSCHALK M., 1999. In «Diseases of swine, 8<sup>th</sup> ed». 563-578. Iowa University Press, Ames, 1209 p.
- KOPIC J., PARADZIK M.T., PANDAK N., 2003. *Lijec. Vjesn.*, 125, 134-137.
- MAROIS C., BOUGEARD S., GOTTSCHALK M., KOBISCH M., 2004a. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 3169-3175.
- MAROIS C., LE DEVENDEC L., GOTTSCHALK M., KOBISCH M., 2004b. *J. Clin. Microbiol.*, soumis.
- MARTINEZ G., HAREL J., LACOUTURE S., GOTTSCHALK M., 2002. *Can. J. Vet. Res.*, 66, 240-248.
- MWANIKI C.G., ROBERTSON I.D., TROTT D.J., ATYEO R.F., LEE B.J., HAMPSON D.J., 1994. *Epidemiol. Infect.*, 113, 321-334.
- OKWUMABUA O., O'CONNOR M., SHULL E., 2003. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, 79-84.
- PEDROLI S., KOBISCH M., BEAUCHET O., CHAUSSINAND J.P., LUCHT F., 2003. *Presse Med.* 32, 599-601.
- RASMUSSEN S.R., AARESTRUP F.M., JENSEN N.E., JORSAL S.E., 1999. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 404-408.
- STAATS J.J., FEDER I., OKWUMABUA O., CHENGAPPA M.M., 1997. *Vet. Res. Commun.*, 21, 381-387.
- TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET J., 2001. In «Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures». 136-141. AEEMA, Paris, France, 696 p.
- WISSELINK H.J., JOOSTEN J.J., SMITH H.E., 2002. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2922-2929.