

P8502

EXCRÉTION DE ROTAVIRUS ET ÉTATS IMMUNITAIRES DU PORCELET DURANT L'ALLAITEMENT ET APRÈS LE SEVRAGE : SIGNIFICATION ÉPIDÉMIOLOGIQUE

A. JESTIN (1), S. BERNARD (2)

(1) Ministère de l'Agriculture - Station de Pathologie Porcine, BP n° 9 - 22440 PLOUFRAGAN.

(2) INRA - Laboratoire de Virologie Porcine - 37380 NOUZILLY.

INTRODUCTION

Le rotavirus est largement répandu dans la population porcine. C'est ainsi que le virus est détecté dans les excréments des porcs et les études sérologiques révèlent qu'un pourcentage élevé des sérums contient des anticorps antirotavirus (CORTIER, VAUTHEROT, 1979).

L'infection à rotavirus du porc est décrite avant et après le sevrage (WOOD *et al.*, 1976 LECCE et KING, 1978). La multiplication de ce virus à tropisme digestif est sous la dépendance de facteurs immunitaires locaux. C'est ainsi que pendant la période de lactation le lait de la mère assure par les anticorps qu'il apporte une protection passive (BOURNE, 1973 PORTER, 1973). Au moment du sevrage, cette immunité passive disparaît et la protection est assurée par les anticorps produits par la muqueuse intestinale (PORTER, 1973). Parallèlement à ces réactions locales des anticorps peuvent apparaître dans le sang.

Le travail que nous présentons a pour objet l'étude des relations entre la multiplication du rotavirus et les états d'immunité au niveau local et dans le sang. Nous avons cherché à mesurer en parallèle l'excrétion du rotavirus, la répartition des différentes classes A, G et M d'anticorps présents dans le tube digestif et l'apparition des anticorps dans le sang afin de préciser la valeur de ces paramètres comme indicateurs épidémiologiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

a) Les animaux et les conditions d'élevage

Dans un élevage de 200 truies des excréments de rotavirus sont mises en évidence chez le porcelet pendant la phase d'allaitement et après le sevrage.

Les truies sont placées en maternité la semaine précédant la date présumée de la mise-bas. Chaque salle est nettoyée et désinfectée entre chaque bande. Les porcelets sont sevrés à 4 semaines d'âge et séjournent cinq semaines dans le bâtiment de post-sevrage sur caillebotis intégral. Ils sont ensuite élevés en porcherie d'engraissement.

b) Protocole

Pour l'étude de l'excrétion du rotavirus 4 porcelets (n° 102, 201, 302 et 408) choisis dans 4 portées différentes sont étudiés, le rang de portée des truies est respectivement 1, 2, 4 et 6. Les fèces de truies sont également collectés quotidiennement pendant la phase d'allaitement.

Des prélèvements fécaux sont effectués quotidiennement et stockés à -20°C pour la recherche de rotavirus et d'immunoglobulines. Les sérums sont collectés à 10, 28, 55 et 90 jours d'âge.

c) Traitement des prélèvements

Tous les prélèvements sont dilués au 1/3 en tampon PBS contenant 0,05% de Tween 20. Les fèces sont clarifiées à 3 000 g pendant 20 minutes.

Détection par ELISA des antigènes rotavirus dans les fèces

La méthode précédemment décrite (SCHERRER BERNARD, 1977) peut être résumée ainsi : des microplaques sensibilisées par des immunoglobulines de lapins spécifiques du rotavirus sont incubées après addition des échantillons. Les antigènes sont détectés par addition d'un conjugué constitué par des immunoglobulines de lapin couplées à la peroxydase.

Détection par ELISA des anticorps dans les fèces

La détection des différentes classes d'immunoglobulines spécifiques du rotavirus est effectuée par une technique ELISA adaptée (CORTHER FRANZ, 1981). Cette technique peut être présentée brièvement de la manière suivante. Des immunoglobulines de lapins présentant une activité spécifique anti-immunoglobulines de classe A, G et M sont préparées par passages sur colonne d'immuno-adsorbants (WRITE et HUNTER, 1982). Les microplaques sont sensibilisées par des immunoglobulines de lapins antirotavirus. Une préparation de virus est ajoutée. Dans une troisième étape les échantillons à tester sont déposés dans les cupules et les anticorps sont révélés par addition de conjugués selon une méthode décrite précédemment (BERNARD JESTIN 1984). Le titre des différentes classes d'immunoglobulines spécifiques est exprimé en $\mu\text{g/ml}$ (BERNARD *et al.*, 1984).

Détection par ELISA des immun-complexes dans les fèces

Les particules virales partiellement saturées par les immunoglobulines sont fixées dans le fond des microplaques selon la technique présentée pour la détection des antigènes. Les immunoglobulines fixées sur les particules virales sont révélées par addition d'un conjugué spécifique des immunoglobulines du porc (CORTHER, 1981).

Étude des anticorps sériques

Les anticorps sériques sont titrés par la méthode ELISA. Des microplaques (NUNC) sont sensibilisées par des immunoglobulines de lapins spécifiques du rotavirus. Dans une première série de cupules une dilution de rotavirus produit sur porcelets est ajoutée, dans une seconde série de cupules une dilution identique de prélèvements fécaux effectués sur porcelets non infectés est ajoutée. Une dilution au 1/100 des sérums à étudier est déposée dans une cupule de chacune des séries. Après une heure d'incubation les anticorps fixés sont révélés par addition d'immunoglobulines de lapins spécifiques des immunoglobulines de porcs conjuguées à la peroxydase. Le titre en anticorps est déterminé par la différence des densités optiques obtenue entre les deux cupules, le titre est exprimée en multipliant ce résultat par dix.

RÉSULTATS

a) Excrétion de rotavirus dans les matières fécales

La multiplication du rotavirus se produit chez les différents porcelets de façon similaire, le virus étant excrété en grande quantité pendant la troisième semaine de vie. L'excrétion du virus est plus précoce chez les porcelets 201 et 408, elle est, chez ces deux porcelets, longue et s'achève quelques jours avant le sevrage.

Après le sevrage le virus est également excrété par les quatre porcelets. Plusieurs pics d'excrétion peuvent être enregistrés à des moments différents. Chez le porcelet 201 deux pics d'excrétion de virus sont notés respectivement 9 et 21 jours après le sevrage. Chez les porcelets 102 et 408 un seul pic d'excrétion de virus est noté une semaine après le sevrage. Le porcelet 302 excrète du virus mais l'excrétion est très faible (figures 1 à 4 en annexe p. 189 à 192).

Le rotavirus n'est pas détecté dans les déjections des truies pendant leur séjour en maternité.

b) Les copro-anticorps

L'examen des résultats obtenus par l'analyse des différentes classes d'immunoglobulines révèle de grandes différences entre les 3 classes G, M et A (figures 1 à 4 en annexe). Les anticorps de classe G et M sont retrouvés en quantité peu importante. La concentration en anticorps de classe A retrouvés dans les fèces est très élevée dès les premiers jours de la phase d'allaitement (277, 143 et 25 $\mu\text{g/ml}$) à l'exception du porcelet n° 102 (7 $\mu\text{g/ml}$). Une décroissance rapide du taux de ces anticorps est observée avant le 10^e jour d'âge chez les 4 porcelets suivis. Ce phénomène de décroissance est identique chez ces mêmes animaux pour les anticorps de classes G et M. La diminution du titre de ces différentes classes d'immunoglobulines peut être transitoire et chez le porc 408 le titre en Ig A augmente pendant la troisième semaine.

Après le sevrage, les anticorps sont retrouvés à des titres faibles dans les fèces. Seuls les titres en anticorps de classe A connaissent quelques variations. Leur titre augmente chez le porcelet n° 201 dès le 34^e jour d'âge au moment du pic d'excrétion du virus, cette augmentation est transitoire et le titre chute en une semaine. Chez le porc 302, le titre en anticorps de classe A augmente après l'entrée de l'animal en porcherie d'engraissement.

c) Les immun-complexes

Les immun-complexes sont retrouvés en grande quantité dans les selles dès les premiers jours de vie. La concentration en immun-complexes est maximum pendant la première semaine de vie. Leur titre diminue rapidement en quelques jours. Puis un second pic d'apparition de ces complexes est observé chez les 4 porcelets. Cette nouvelle augmentation des immun-complexes correspond à un pic d'excrétion de rotavirus.

Après le sevrage, les immun-complexes sont excrétés dans les fèces à des titres constants. Chez le porcelet n° 201, le titre reste très faible. Après l'entrée en porcherie d'engraissement la concentration de ces formes complexées aux anticorps peut diminuer notamment chez le porcelet n° 302.

d) Les anticorps sériques

Les titres en anticorps sériques des porcelets sont relativement homogènes pendant la phase de lactation et ne dépendent pas du rang de portée de la mère. Ces titres diminuent par la suite. Après le sevrage ces titres augmentent progressivement chez les quatre porcelets et cette augmentation ne dépend pas des pics d'excrétion de rotavirus observés chez l'animal.

DISCUSSION

Cette étude a porté sur un nombre réduit de porcelets dans le même élevage. Les quatre porcelets suivis ont été prélevés tous les jours pendant trois mois. Cinq paramètres ont été étudiés pour chacun des 350 prélèvements effectués. Dans ces conditions il a été possible d'analyser de façon détaillée la séquence des événements dans le tube digestif du porcelet. Les conclusions de ce travail sont relatives à des comportements individuels et ne peuvent donc pas être généralisées.

Le rotavirus est excrété chez tous les porcelets au même moment. Cette observation peut être expliquée par un degré de réceptivité particulier à cette période ou par une explosion de l'infection dans la maternité à cette date. Cette concentration importante de virus dans la maternité soulève le problème de l'origine de ce virus. Il peut être présent dans les locaux avant l'introduction des animaux ou bien il peut être apporté par des truies excrétrices. La possibilité pour les truies d'excréter du virus dans les fèces au moment de la phase d'allaitement a été mise en évidence par BENFIELD (BENFIELS *et al.* 1982). Or, dans cette étude, le rotavirus n'a pas été détecté dans les déjections des truies pendant la durée de leur séjour en maternité. Cependant les formes complexées par les anticorps n'ont pas été recherchées chez les truies. Les particules virales peuvent persister sous forme infectieuse dans les fèces souillant le sol des porcheries (WOOD, BOHL, 1981) et sont relativement résistants aux désinfectants usuels (SNODGRASS, HERRING, 1977). Il est difficile, dans ces conditions, de prévenir la contamination des animaux qui occupent des locaux contaminés par la bande précédente.

Cette excrétion de virus en présence d'anticorps locaux suggère l'existence de différents sérotypes de rotavirus dans le même élevage. Cette hypothèse est en accord avec les études des différents sérotypes de rotavirus effectuées par séro-neutralisation (BEARDS *et al.* 1980). Actuellement les virus détectés dans les excréments lors des différentes phases d'excrétion virale sont analysés. Le profil des A. R. N. génomiques est testé par électrophorèse en gel de poly-acrylamide (NICOLAS *et al.* 1983).

Les titres des anticorps des classes A, G et M sont les plus élevés les premiers jours, puis dès le 10^e jour les titres diminuent rapidement. Cette observation est en accord avec les résultats d'autres travaux qui démontrent que les titres en anticorps du lait diminuent vers le 10^e jour (ASKAA *et al.* 1983). L'influence du rang de portée de la truie sur le titre en anticorps du lait est en partie vérifiée dans nos observations. Le titre le plus faible en anticorps de classe A est retrouvé chez le porcelet n° 102, issu de primipare.

Il est prouvé que pendant la phase de lactation, les anticorps de classe A jouent le rôle le plus important dans la protection immunitaire passive de l'animal mais après le sevrage le rôle des anticorps est moins bien précisé. Dans notre étude après le sevrage, la multiplication du virus peut survenir sans variation des titres en anticorps locaux, et cette multiplication virale n'est pas suivie d'une forte augmentation du titre en anticorps retrouvés dans les fèces. Cependant une légère augmentation du titre en anticorps de classe A peut être enregistrée. Sachant que l'immunité intestinale est courte, ce phénomène est une preuve indirecte que le tube digestif est exposé en continu au rotavirus.

Dans ces conditions seuls les anticorps de classe A sont indicateurs du degré de protection du porcelet pendant les premiers jours de vie, mais quel que soit le titre en anticorps il chute brutalement à un titre assurant mal la protection passive de l'animal. Après le sevrage le titre en copro-anticorps de classe A est un mauvais indicateur d'une protection immunitaire et un témoin peu fiable d'une excrétion récente de virus.

La mise en évidence de ces formes virales complexées soulève le problème de leur origine. Il est probable que le virus infecte le porcelet précocement, à un moment où la concentration en anticorps est maximale saturant partiellement, voire totalement, les particules virales formées au niveau des villosités intestinales. Cette neutralisation des particules virales n'est plus effective dès que le titre en IgA diminue, les particules virales pénètrent alors dans les villosités plus librement provoquant ainsi une infection massive. Après le pic d'excrétion du virus le titre en immun-complexes diminue parallèlement à la concentration en rotavirus. Un équilibre existe, au niveau du tube digestif, entre le nombre de particules virales et les titres en anticorps locaux. Cet équilibre qui a fait l'objet d'études antérieures (CORTHIER, FRANZ, 1981) reste cependant délicat à préciser. Plusieurs remarques s'imposent : les techniques utilisées ne permettent pas de détecter les particules virales complètement saturées par les anticorps, de la même manière les techniques détectant les immun-complexes ne précisent pas le degré de saturation des virus présents dans l'échantillon étudié.

Si pendant la phase de lactation un équilibre existe entre le virus et les anticorps, après le sevrage cet équilibre n'est plus observé, en effet, la multiplication du virus peut survenir sans relation avec le titre en anticorps locaux et en immun-complexes. Ces résultats suggèrent que la quantité de virus est en excès par rapport à la faible concentration en anticorps locaux.

Après la perte des anticorps passifs les animaux synthétisent des anticorps actifs. Cette augmentation des titres correspond à une synthèse continue d'anticorps après le sevrage. Elle est décrite également chez les porcelets qui n'ont présenté aucun pic d'excrétion de rotavirus. Cette observation permet de confirmer que le tube digestif est exposé en permanence au rotavirus. Dans ces conditions le niveau des anticorps sériques ne peut pas être considéré comme un témoin d'une récente excrétion virale en pic.

Conséquence d'ordre épidémiologique et prophylactique :

A la lumière de ces résultats deux périodes bien distinctes peuvent être considérées : la période de lactation et celle suivant le sevrage.

Pendant la lactation, qui constitue la phase la plus critique, un équilibre existe entre les particules de virus et la concentration en anticorps locaux. Si l'on souhaite retarder la phase de multiplication de virus ou atténuer son intensité deux solutions peuvent être proposées : augmenter la richesse du lait en anticorps ou diminuer la pression infectieuse dans le local. Afin d'augmenter la concentration en anticorps du lait, des truies et plus particulièrement les jeunes reproductrices peuvent être contaminées par voie orale pendant la gestation à partir des diarrhées de porcelets contenant du rotavirus. Afin de diminuer la pression infectieuse dans le local, l'attention doit être attirée sur la nécessité d'un nettoyage et d'un vide sanitaire après utilisation d'un désinfectant actif sur ce virus. L'activité virucide des principaux désinfectants a été étudiée dans les conditions du laboratoire, leur activité dans les conditions pratiques de l'élevage reste à préciser (MARIS, 1985). Toutes les autres conditions tendant à diminuer le risque de contamination précoce du jeune porcelet doivent être réunies. Ainsi, dans un même local, le groupage des mises-bas permet d'éviter la naissance de porcelets dans un milieu fortement contaminé à partir des porcelets nés quelques jours auparavant. Cette excrétion de rotavirus vers le 10^e jour d'âge correspond également à la période d'apparition de la « diarrhée blanche » chez les porcelets. Le rôle déterminant du rotavirus dans l'étiologie de cette diarrhée est encore discuté (JESTIN, 1984), cependant son rôle aggravant justifie une action au niveau de l'élevage tendant à freiner la multiplication de ce virus.

Après le sevrage le rotavirus est également excrété par le porcelet mais les paramètres immunitaires suivis ne permettent pas de préciser les conditions de multiplication de ce virus. C'est pourquoi il serait hasardeux, dans l'état actuel des connaissances, de proposer un schéma de maîtrise de l'infection à rotavirus. Le porcelet, infecté sur un mode chronique, peut excréter en pics ce virus mais ces excrétions de virus ne sont pas associées aux épisodes de diarrhées. Dans ces conditions les interventions à encourager portent sur l'hygiène générale afin de diminuer la pression infectieuse dans les élevages.

CONCLUSION

L'étude des différentes classes de copro-anticorps et des anticorps sériques anti-rotavirus permet de mieux comprendre les conditions de multiplication de ce virus chez le porcelet. Deux périodes bien distinctes existent : la période de lactation et celle suivant le sevrage. Pendant toute la phase de lactation le porcelet est protégé par les anticorps du lait et plus particulièrement les anticorps de la classe A. Dès les premiers jours de vie le porcelet est contaminé par le rotavirus. Ce virus est neutralisé par les anticorps d'origine maternelle durant la première semaine. Dès le 10^e jour, la concentration en anticorps retrouvés dans le tube digestif diminue et à cette diminution correspond une multiplication de rotavirus qui est excrété sous forme libre ou sous forme

complexée aux anticorps locaux. Un équilibre existe entre les anticorps, les particules virales et les formes complexées. Le titrage des virus sous forme libre et complexée et des copro-anticorps permet d'apprécier l'équilibre immunitaire existant au niveau du tube digestif.

Après le sevrage la multiplication du virus est également décrite mais l'évolution de cette infection est indépendante de la concentration en anticorps locaux. Des formes complexées aux anticorps sont également présentes mais l'équilibre observé pendant la phase de lactation n'est pas retrouvé. Aussi d'autres paramètres immunitaires, intervenant dans la multiplication de ce virus, sont à rechercher.

L'excrétion du virus sur un mode chronique serait à l'origine de l'apparition d'anticorps sériques dont le titre serait indépendant de l'excrétion en pics de ce virus. Ces observations soulèvent le problème de l'interprétation des résultats sérologiques pour l'étude de cette infection.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Marguerite LE MENEZ (Laboratoire Vétérinaire Départemental des Côtes-du-Nord St Briec), le Docteur GENEST, L. LE CALVE, E. LE MASLE, (Association des Producteurs de Porcs des Mauges-Séné 56000 VANNES) C. PERROT, B. BEAUREPAIRE (Station de Pathologie Porcine de Ploufragan) et I. LANTIER (I.N.R.A. Laboratoire de Pathologie Porcine Nouzilly) pour leur collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

- ASKAA J., BLOCH B., BERTELSEN G., RASMUSSEN K. O. (1983) Nord. Vet. Med., **35**, 441-447.
- BEARDS G. M., PILFORD J. N., THOULESS M. E., FLEWETT T. H. (1980) J. Med. Virol., **5**, 221-237.
- BERNARD S., GROM J., LANTIER I. (1984) Ann. Rech. Vet., **15**, (sous presse).
- BERNARD S., JESTIN A. (1984) Zbl. Vet. Med., 1984, (sous presse).
- BENFIELD D. A., RONMOURE I. S., ADDAR G. M. (1982) J. Clin. Microbiol., **16**, 186-190.
- BOURNE F. J. (1973) Proc. Nutr. Soc., **32**, 205-215.
- CORTIER G. (1981) J. Virol. Methods, **3**, 277-282.
- CORTIER G., FRANZ J. (1981) Inf. Imm., **31**, 833-836.
- CORTIER G., VAUTHEROT J. F. (1979) Ann. Rech. Vet., **10**, 65-69.
- DE LEEUW E. W., ELLENS D. J., HILBINK (1979) Colloques de l'Inserm, **90**, 349-354.
- JESTIN A., MADEC F. (1984) Rec. Med. Vet., (sous presse).
- JESTIN A. (1984) Proceeding IPVS Gand, p. 57.
- LECCE J. G., KING M. W. (1978) J. Clin. Microbiol., **8**, 454-458.
- MARIS P. (1985) Ann. Rech. Vet. (publication en cours).
- NICOLAS J. C., LOURENCO M. H., MARCHAL S., COHEN J., SCHERRER R., BRICOUT F. (1983) Ann. Virol. (Inst. Pasteur), **134 E**, 135-139.
- PORTER P. (1973) Vet. Rec., **92**, 658-664.
- SCHERRER R., BERNARD S. (1977) Ann. Microb. Inst. Pasteur, **128 A**, 499-510.
- SNODGRASS D. R., HERRING J. A. (1977) Vet. Rec., **101**, 81-82.
- WOOD G. N., BRIDGER J. C., HALL G. A., JONES J. N., JACKSON G. (1976) J. Med. Microbiol., **9**, 203-209.
- WOOD G. N., BOHL E. H. (1981) 5th Ed. Iowa St. Mn. Press., 310-323.
- WRITE J. P., HUNTER W. M. (1982) J. Im. Methods, **48**, 311-325.

FIGURE 1

CINÉTIQUE DES ROTAVIRUS DES IMMUN-COMPLEXES ET DES ANTICORPS CHEZ LE PORC N° 102

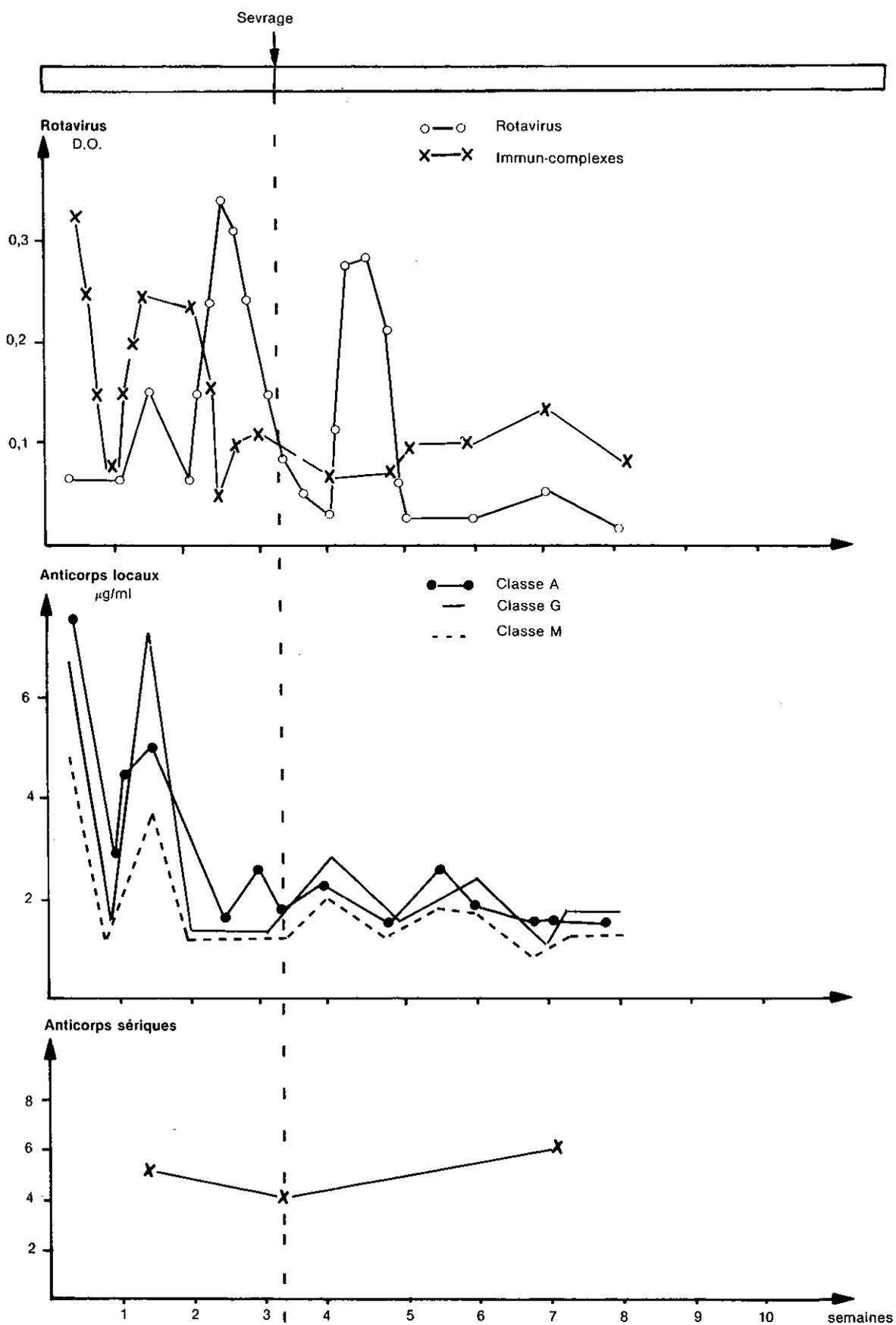


FIGURE 2

CINÉTIQUE DES ROTAVIRUS DES IMMUN-COMPLEXES ET DES ANTICORPS CHEZ LE PORC N° 201

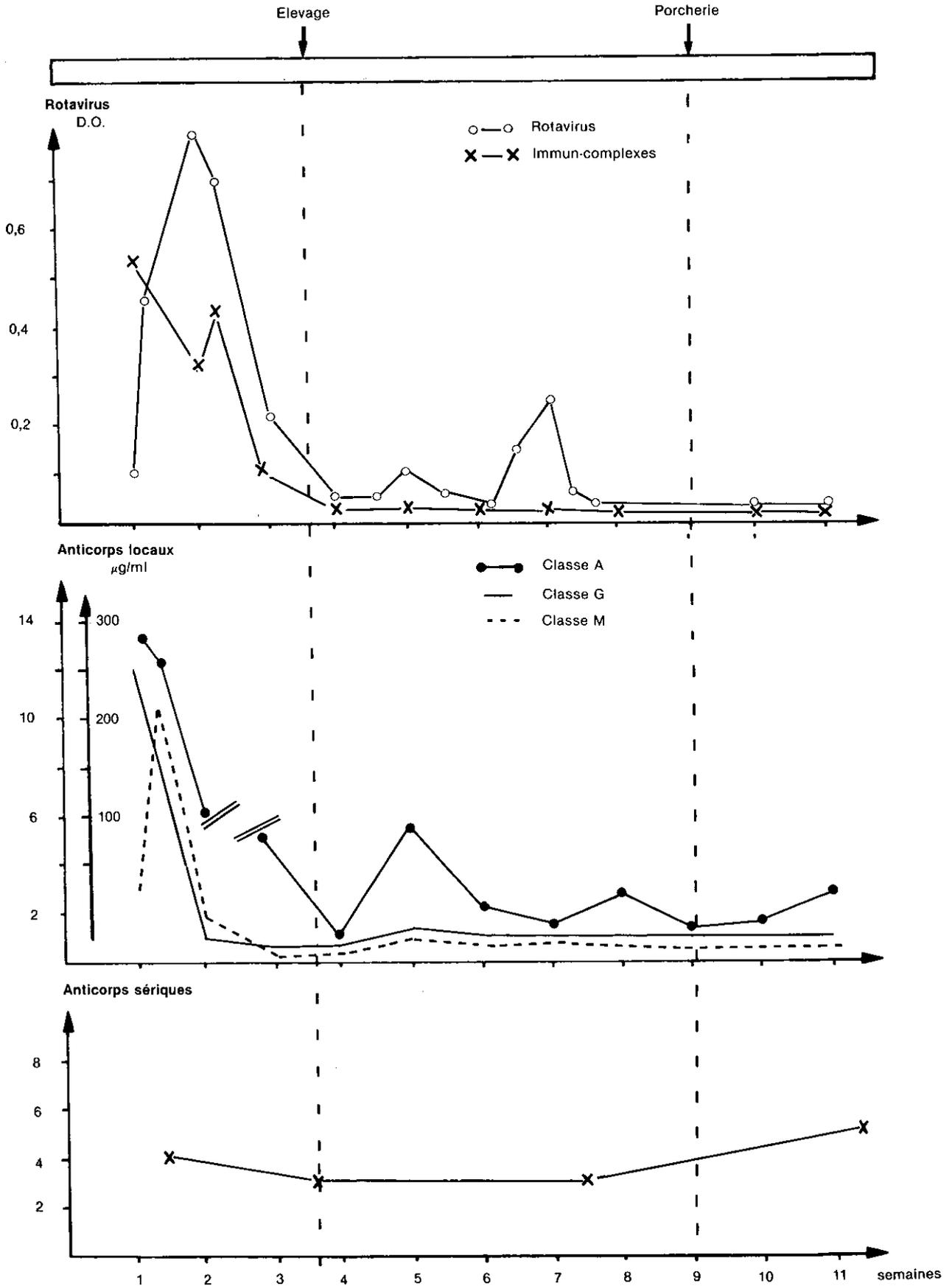


FIGURE 3

CINÉTIQUE DES ROTAVIRUS DES IMMUN-COMPLEXES ET DES ANTICORPS CHEZ LE PORC N° 302

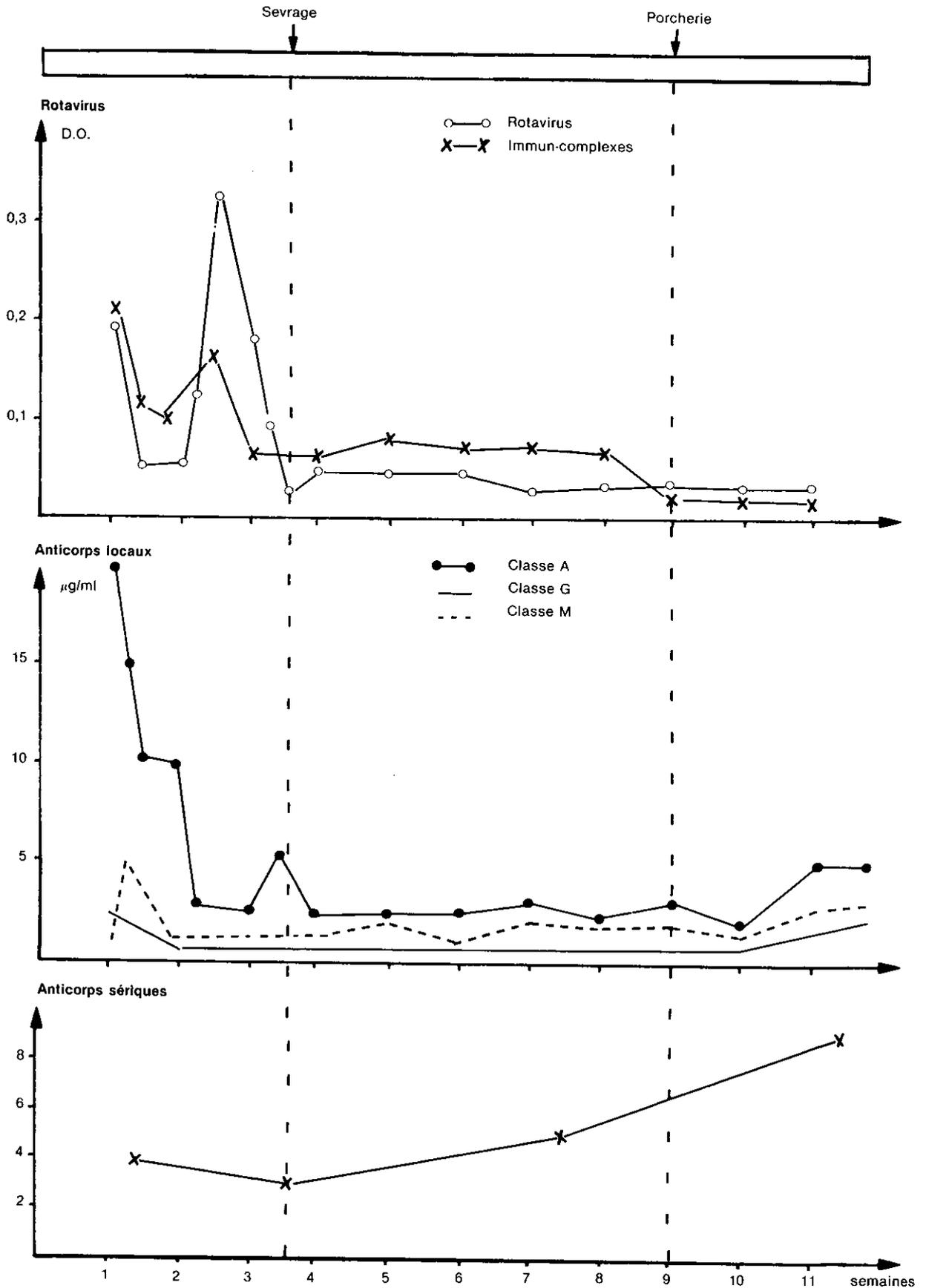


FIGURE 4

CINÉTIQUE DES ROTAVIRUS DES IMMUN-COMPLEXES ET DES ANTICORPS CHEZ LE PORC N° 408

