

ISOLEMENT DU VIRUS DE LA GASTRO-ENTÉRITE TRANSMISSIBLE DU PORC SUR CULTURES CELLULAIRES ET COMPARAISONS ANTIGÉNIQUES AVEC DEUX SOUCHES AMÉRICAINES

G. C. Dulac, P. Boulanger et J. B. Phaneuf*

INTRODUCTION

DEPUIS QUELQUES ANNÉES, on observe au Canada des cas cliniques de gastro-entérite transmissible (GET) (4,5). À date, les travaux relatifs à la GET s'intéressaient surtout à l'épizootologie et à la transmission expérimentale de la maladie chez les porcelets (4,5). La présente étude se rapporte à un cas clinique confirmé par l'isolement du virus sur cultures de cellules de porc. Elle compare aussi la souche isolée à deux souches américaines de référence.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cas Clinique

De janvier à avril 1971, des vétérinaires praticiens de la région de Berthier, au Québec, observèrent une affection intestinale porcine caractérisée par des vomissements et une diarrhée très fluide. Les signes cliniques étaient plus prononcés chez les porcelets que chez les truies. Le taux de mortalité enregistré chez les porcelets âgés d'un à dix jours s'élevait à 100% ; il n'atteignit cependant que 10% chez les sujets âgés de quatre semaines.

Au moment de la nécropsie de quelques sujets affectés, l'un de nous (J.B.P.), préleva des segments de jéjunum chez des porcelets ayant manifesté des signes cliniques pendant quatre jours et les conserva à -70°C , jusqu'à ce qu'ils soient expertisés en laboratoire.

Virus de référence

Nous avons utilisé deux souches de référence du virus de la GET. La première (souches d'Ames) provenait du Dr. G. Lambert¹ ;

*Division de la Pathologie Animale, Direction de l'Hygiène vétérinaire, Ministère de l'Agriculture du Canada, Institut de Recherches Vétérinaires, B.P. 11300, Station H, Ottawa, Ontario, Canada K2H 8P9 (Dulac et Boulanger) et Laboratoire de Pathologie Animale, Ministère de l'Agriculture de Québec, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6 (Phaneuf).

¹Dr. G. Lambert. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, National Animal Disease Laboratory, Post Office Box 70, Ames, Iowa 50010

elle était déjà adaptée aux cellules rénales de porc. La deuxième (souche de Purdue) provenait du Dr. E. O. Haelterman² ; elle en était à son dixième passage consécutif chez des porcelets âgés de cinq à dix jours (6). Nous l'avons adaptée aux cultures de cellules rénales et thyroïdiennes de porc dans notre laboratoire. La souche canadienne de la GET provenait de l'un des cas cliniques qui fait l'objet de cette publication. Cette souche sera dorénavant appelée ADRI-1.

Sérums immuns de référence

Le Dr. Lambert nous a fourni le sérum immun correspondant à la souche d'Ames. Nous en avons préparé un, contre la souche de Purdue, selon la méthode décrite par Witte et Easterday (13).

Sérum immun à expertiser

Le sérum immun contre la souche ADRI-1 provenait de l'un des porcs qui survécut aux épreuves de transmission réalisées avec l'échantillon clinique.

Porcs

Tous les porcs utilisés lors de la préparation des sérums immuns et des cellules rénales, ainsi que ceux utilisés lors des épreuves de transmission, provenaient du troupeau exempt d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) de notre Institut (8). Les glandes thyroïdes, utilisées lors de la préparation des cellules thyroïdiennes, provenaient de porcs abattus localement.

Cultures cellulaires

Les cultures de cellules rénales et thyroïdiennes porcines ont été préparées selon les méthodes de Greig (9) et de Witte et Easterday (13) respectivement. Dans les deux cas, cependant, le milieu de croissance fut celui utilisé par Greig (9) auquel on ajouta 10% de sérum foetal bovin. Le milieu de survie fut

²Dr. E. O. Haelterman. Purdue University, School of Veterinary Science and Medicine, Department of Veterinary Microbiology, Pathology and Public Health, West Lafayette, Indiana 47907

celui de Eagle MEM, complété avec 2 ou 5% de sérum.

Épreuves sérologiques

Épreuve de neutralisation – On effectua les épreuves de séro-neutralisation croisées dans des cultures de cellules thyroïdiennes en tubes, selon la méthode conventionnelle : quantité constante de virus *versus* quantité décroissante de sérum. Nous avons employé une dose standard de 100 DICC₅₀³ de chacun des trois virus mentionnés auparavant. Après avoir mis en contact le mélange virus-sérum pendant une heure, à 37°C, et l'avoir adsorbé durant une heure sur les cellules, nous avons ajouté le milieu de survie. Les tubes, maintenus en position stationnaire, ont été examinés quotidiennement pendant cinq jours. On détermina les titres d'anticorps selon la méthode de Reed et Muench (12).

Épreuve de la déviation du complément – Nous avons utilisé cette épreuve afin de définir les relations antigéniques entre la souche ADRI-1 et les deux souches américaines de référence (Ames et Purdue). On a déjà publié la technique de l'épreuve modifiée de la déviation du complément (1), à l'exception de la préparation des antigènes. À cette fin on inocula des cellules rénales porcines, cultivées en flacons de Blake, avec 10⁵ DICC₅₀ de chacune des trois souches du virus de la GET. Après une heure d'adsorption à 37°C, on ajouta le milieu de survie contenant 2% de sérum foetal bovin et on remit les flacons à l'étuve, jusqu'à l'obtention d'un effet cytopathogène (ECP) maximum. Après avoir fait éclater les cellules par la congélation, on sédimenta les débris cellulaires à 200 × g, durant 30 minutes. On concentra le surnageant de 40 à 80 fois dans l'appareil à pression-dialyse d'Amicon, pourvu d'une membrane de type XM-50⁴. On clarifia le surnageant concentré en le centrifugeant et on le congela à -20°C, avant de l'utiliser dans l'épreuve modifiée de la déviation du complément.

Technique de l'immunofluorescence

Nous avons utilisé cette technique afin de déterminer si deux conjugués immunofluorescents, préparés contre deux souches de référence américaines, pourraient servir à déceler le virus ADRI-1 dans la muqueuse intestinale des porcelets et dans les cultures cellulaires rénales et thyroïdiennes infectées. Une publi-

cation antérieure décrit les méthodes de préparation des conjugués fluorescents ainsi que la technique de l'immunofluorescence (2).

Transmission expérimentale aux porcelets

On utilisa une partie des échantillons prélevés chez les porcelets malades décrits auparavant, afin de préparer une suspension tissulaire de 10% dans le tampon de Dulbecco (7). Par la suite, on administra par voie orale, à chacun des quatre porcelets de sept jours, une partie de cette suspension décontaminée (14), à raison de 1 ml par porcelet. Un autre porcelet témoin reçut 1 ml de la solution tampon. On garda ces porcelets individuellement dans des unités d'isolement du type Horsfall, jusqu'à la fin des expériences.

Inoculation de cultures cellulaires

On administra à des porcelets une partie de la suspension à expertiser ; on en inocula une autre partie dans dix tubes de 15 × 110 mm et cinq tubes de Leighton de cellules rénales, ainsi que dans un nombre égal de tubes de cellules thyroïdiennes. On observa les cellules quotidiennement durant cinq jours. On récolta ces cellules, ainsi que les milieux de survie dans les tubes, en vue d'effectuer deux passages successifs. On fixa avec de l'acétone les cellules cultivées sur lamelles en tubes de Leighton et on les colora avec les conjugués immunofluorescents décrits auparavant.

RÉSULTATS

Inoculation d'animaux

De 24 à 36 heures après l'administration orale de la suspension préparée avec des segments de jéjunum, provenant du cas clinique, les quatre porcelets expérimentaux manifestèrent des signes cliniques compatibles avec ceux de la GET : une diarrhée très liquide et des vomissements se produisant quelques minutes après l'ingestion de lait. On procéda alors à l'euthanasie de deux de ces porcelets et on préleva leur jéjunum dans le but d'isoler le virus en cultures cellulaires et d'effectuer l'épreuve d'immunofluorescence sur des sections transversales de ces tissus (11).

Les lésions macroscopiques se limitaient au système digestif. L'estomac était très dilaté et rempli de lait caillé. Quant à l'intestin grêle, il était aussi dilaté, atonique et rempli d'un liquide jaunâtre, dans lequel baignaient quelques caillots de lait. À la palpation, la paroi de l'intestin grêle de ces deux porcelets s'avéra beaucoup plus mince que la normale. Un examen au microscope stéréoscopique révéla une atrophie des villosités intestinales dans la

³DICC₅₀: Dose infectant les cultures cellulaires dans une proportion de 50%.

⁴Amicon Corporation, 21 Hartwell Ave., Lexington, Mass. 02173

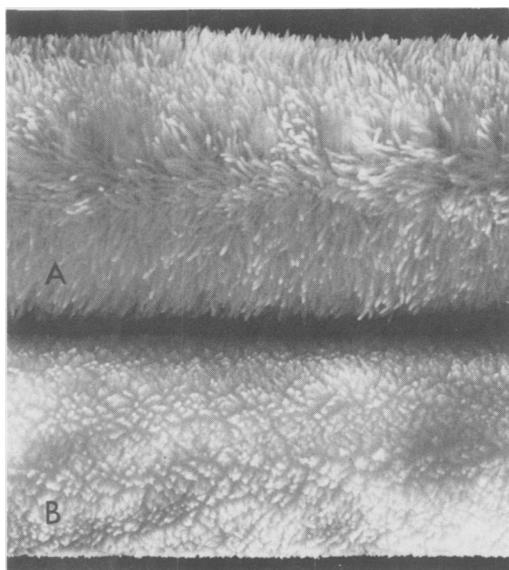


PHOTO 1. A) Segment du jéjunum d'un porcelet normal, âgé de neuf jours ; noter la longueur des villosités. B) Segment du jéjunum d'un porcelet du même âge, infecté depuis 48 heures avec la souche ADRI-1 de la GET; noter l'atrophie des villosités. $\times 5$.

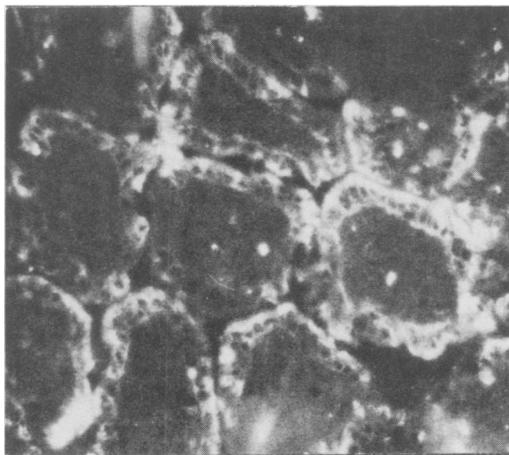


PHOTO 2. Coupe transversale d'un groupe de villosités intestinales, infectées depuis 48 heures par le virus ADRI-1 et colorées par un conjugué immunofluorescent préparé contre la souche Ames de la GET; noter la fluorescence intra-cytoplasmique limitée aux cellules absorbantes de ces villosités. $\times 350$.

plupart des segments examinés (Photos 1 A,B). L'immunofluorescence permet aussi de déceler des agrégats d'antigène de la GET dans le cytoplasme des cellules absorbantes de la muqueuse de l'intestin grêle (Photo 2).

Chez les deux porcelets survivants, la diarrhée atteignit son paroxysme deux jours après

l'inoculation ; elle diminua ensuite graduellement dans les jours suivants. Ces sujets demeurèrent ensuite cliniquement normaux jusqu'à la fin de l'expérience. Nous avons cependant réussi à déceler la présence d'anticorps neutralisants à l'endroit des deux souches de référence et de la souche ADRI-1, 21 jours après l'infection expérimentale de ces deux porcelets. Au cours de cette même période, le porcelet témoin ne manifesta pas de signes cliniques et ne développa pas d'anticorps neutralisants.

Inoculation de cultures cellulaires

Cellules rénales porcines – Après trois passages successifs sur des cultures cellulaires de rein de porc, il s'avéra impossible d'isoler directement l'agent causal à partir des segments de jéjunum provenant du cas clinique. Toutefois, comme nous le mentionnions au paragraphe précédent, l'administration d'une partie de ces segments à des porcelets susceptibles avait provoqué chez eux des signes cliniques caractéristiques de la GET. Nous avons toutefois réussi à isoler le virus en cultures de cellules rénales, à partir des suspensions préparées avec le jéjunum de nos porcelets expérimentaux. Malgré l'absence d'ECP dans ce type de cellules, l'immunofluorescence nous permit de démontrer, dès le premier passage, la présence d'antigène viral de la GET dans le cytoplasme de ces cellules. Au second passage sur cellules rénales, on décela un ECP ; l'immunofluorescence nous permit de l'attribuer au virus de la GET. En dépit de la présence d'un ECP dès le deuxième passage du virus, celui-ci ne détruisait pas complètement le tapis cellulaire, même au sixième passage. Nous avons parfois observé que les cellules affectées se détachaient, tandis que les cellules intactes continuaient à se multiplier et à reformer le tapis cellulaire.

Cellules thyroïdiennes porcines – La suspension préparée avec les segments de jéjunum provenant de porcs infectés naturellement produisit un ECP marqué et semblable à celui qu'a décrit Witte (14), dès le premier passage sur des cultures de cellules thyroïdiennes. L'immunofluorescence nous permit de déceler la présence du virus de la GET dans le cytoplasme des cellules lésées.

Contrairement à ce que nous avons observé avec les cultures de cellules rénales, celles de cellules thyroïdiennes donnèrent un ECP progressif et facile à interpréter.

Identification de la souche ADRI-1

Le virus isolé du cas clinique produisit le syndrome de la GET chez nos porcelets expéri-

mentaux. L'ECP en cultures de cellules rénales ou thyroïdiennes, s'avéra semblable à celui qu'ont décrit divers auteurs pour d'autres souches du virus de la GET (3,10,13,14).

Les épreuves croisées de séro-neutralisation, effectuées avec les souches ADRI-1, Purdue et Ames, démontrèrent une relation immunologique réciproque entre ces souches. L'épreuve de la déviation du complément décèle aussi des antigènes communs entre la souche canadienne et les deux souches américaines de référence. L'antisérum de la souche Purdue possédait cependant des titres homologues, légèrement supérieurs aux titres hétérologues. Les conjugués immunofluorescents préparés avec les souches d'Ames et de Purdue permirent de déceler la souche ADRI-1 en cultures cellulaires.

DISCUSSION

Les observations cliniques, tant sur la ferme qu'au laboratoire, ainsi que les résultats des examens virologiques, démontrent que la maladie en cause était bien la gastro-entérite transmissible.

Nous n'avons pas réussi à isoler directement le virus sur cellules rénales de porc avec les tissus de porcelets infectés naturellement, mais seulement après un passage chez des sujets susceptibles. Les difficultés éprouvées lors de l'isolement du virus dans des cultures de cellules rénales seraient attribuables à plusieurs facteurs, entre autres : la diminution rapide de la concentration virale dans l'intestin après l'apparition des signes cliniques (11), l'apparition d'inhibiteurs dans l'intestin (14) et l'insensibilité relative des cellules rénales à l'endroit du virus de la GET (13). Afin de minimiser les effets de ces facteurs défavorables à l'isolement du virus, il faut prélever les échantillons dès que les sujets malades commencent à vomir.

Le choix du système cellulaire revêt aussi une grande importance. En effet, l'utilisation de cultures de cellules thyroïdiennes nous a permis de déceler l'ECP dès le premier passage. Par contre, il nous a fallu effectuer deux passages successifs du virus dans des cultures de cellules rénales avant de pouvoir observer un ECP. Les cellules thyroïdiennes se sont aussi avérées préférables aux cellules rénales pour les épreuves de séro-neutralisation, parce que l'ECP du virus y est d'apparition rapide, progressif et d'interprétation plus facile. Les résultats des épreuves de titrage du virus et de séro-neutralisation y sont aussi plus faciles à reproduire.

Les résultats positifs des épreuves de séro-neutralisation, que nous avons effectuées avec le sérum de porcelets convalescents, suggèrent la possibilité de poser un diagnostic avec cette méthode, même si l'on ne réussit pas à isoler le virus.

Le comportement de la souche ADRI-1 en cultures cellulaires ressemblait à celui décrit pour les souches américaines du virus de la GET (10,13). Les épreuves de séro-neutralisation, d'immunofluorescence et de déviation du complément démontrèrent aussi sa similitude antigénique avec les deux souches américaines de référence.

L'épreuve directe modifiée de la déviation du complément a permis de déceler les anticorps de la GET dans le sérum de porcs hyperimmuns. Des travaux sont en cours afin de déterminer l'efficacité éventuelle de cette méthode pour le diagnostic sérologique des cas de GET.

RÉSUMÉ

A partir du jéjunum de porcelets infectés naturellement, les auteurs ont réussi à isoler le virus de la gastro-entérite transmissible sur des cultures de cellules thyroïdiennes et rénales de porc. Cette souche n'a pu être différenciée de deux souches témoins américaines, à l'aide d'épreuves de séro-neutralisation, de déviation du complément et d'immunofluorescence. Contrairement à ce que nous avons observé dans les cellules rénales, on a constaté que dans les cellules thyroïdiennes le virus de la gastro-entérite transmissible produit un effet cytopathogène caractéristique et progressif qui se développe rapidement. Ainsi les cellules thyroïdiennes se sont avérées préférables aux cellules rénales pour l'isolement et le titrage du virus, ainsi que pour les épreuves de séro-neutralisation.

SUMMARY

The virus of transmissible gastroenteritis (TGE) was isolated from field specimens on porcine thyroid cells and on pig kidney cells. The newly isolated strain could not be differentiated from two American reference strains by the serum neutralization, the complement fixation and the immunofluorescence tests. The rapidly developing and progressive cytopathic effect seen in pig thyroid cells infected with TGE virus made them more appropriate than the pig kidney cells for virus isolation, virus titration and for the serum neutralization tests.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier monsieur M. Picard pour sa collaboration technique et le docteur M. Beauregard pour avoir revu et corrigé le manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOULANGER, P., G.L. BANNISTER, D.P. GRAY, G.M. RUCKERBAUER and N.G. WILLIS. African Swine Fever II. Detection of the virus in swine tissues by means of modified direct complement-fixation test. *Can. J. comp. Med.* 31: 7-11. 1967.
2. BOULANGER, P., G.L. BANNISTER, A.S. GREIG, D.P. GRAY, G.M. RUCKERBAUER and N.G. WILLIS. African Swine Fever IV. Demonstration of the viral antigen by means of immunofluorescence. *Can. J. comp. Med.* 31: 16-23. 1967.
3. CARTWRIGHT, S.F., H.M. HARRIS, I.B. BLANDFORD, I. FENCHAM and M. GITTER. A cytopathic virus causing a transmissible gastroenteritis in swine I. Isolation and properties. *J. comp. Path.* 75 : 387-396. 1965.
4. DITCHFIELD, J., H.G. PEARCE, R.D. JOLLY and R.A. CURTIS. A viral gastroenteritis of Ontario swine I. Clinical illness and recovery of the virus. *Can. J. comp. Med.* 31: 193-196. 1967.
5. DJURICKOVIC, S., J. THORSEN, J.R. DUNCAN and C.K. ROE. Transmissible gastroenteritis of swine in Ontario. *Can. J. comp. Med.* 33: 59-63. 1969.
6. DOYLE, L.P. and L.M. HUTCHINGS. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Am. vet. med. Ass.* 108: 257-259. 1946.
7. DULBECCO, R. and M. VOGT. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. exp. Med.* 99: 167-182. 1957.
8. GIRARD, A. et D. MITCHELL. Production de porcs exempts d'organismes pathogènes (EOPS) primaires et établissement d'un troupeau de porcs EOPS secondaires. *Can. J. comp. Med.* 26: 279-284. 1962.
9. GREIG, A.S., G.L. BANNISTER, D. MITCHELL and A.H. CORNER. Studies on pathogenic porcine enteroviruses II. Isolation of virus in tissue culture from brain and feces of clinical cases. *Can. J. comp. Med.* 25: 142-150. 1961.
10. McCLURKIN, A.W. Studies on transmissible gastroenteritis of swine I. The isolation and identification of a cytopathogenic virus of transmissible gastroenteritis in primary swine kidney cell cultures. *Can. J. comp. Med.* 29: 46-53. 1965.
11. PENSART, M.B., E.O. HAELTERMAN and T. BURNSTEIN. Transmissible gastroenteritis of swine: Virus-intestinal cell interaction. 1. Immunofluorescence, histopathology and virus production in the small intestine through the course of infection. *Arch. ges. Virusforsch.* 31: 321-334. 1970.
12. REED, L.J. and H.A. MUENCH. A simple method of estimating fifty per cent end-points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497. 1938.
13. WITTE, K.H. and B.C. EASTERDAY. Isolation and propagation of the virus of transmissible gastroenteritis of pigs in various pig cell cultures. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 327-350. 1967.
14. WITTE, K. Isolation of the virus of transmissible gastroenteritis (TGE) from naturally infected piglets in cell culture. *Zentbl. Vet. Med.* 18: 770-778. 1971.

PRIX VÉTÉRIINAIRE GAINES

Dans le but d'encourager le progrès en médecine et en chirurgie des petits animaux, la compagnie General Foods Limited, par l'entremise du Centre de Services professionnels Gaines, a institué le "prix vétérinaire Gaines".

Ce prix sera décerné annuellement à un vétérinaire dont on aura jugé que le travail a contribué éminemment à l'avancement de la médecine et de la chirurgie des petits animaux, soit en recherches cliniques ou soit en recherches fondamentales. La présentation de l'œuvre à évaluer devra avoir fait l'objet d'une publication dans des revues vétérinaires d'envergure ou d'une communication à des congrès professionnels. On considérera en premier lieu les travaux exécutés au cours des cinq dernières années, bien que, en second lieu, on puisse aussi apprécier les œuvres antérieures à cette période pour des membres qui demeureraient toujours actifs.

Toute personne peut, jusqu'au 31 mars 1975 au plus tard, présenter des candidats pour le prix de 1975 en s'adressant au Comité exécutif de l'ACV. Avec chaque recommandation, le proposeur devra soumettre une description des travaux de son candidat. Il devra aussi démontrer comment ces travaux ont contribué à l'avancement de la médecine et de la chirurgie des petits animaux et soumettre une bibliographie pertinente (s'il en existe) en même temps qu'une notice biographique.

Le prix consistera en un médaillon d'or accompagnant une somme de \$500.00. Le tout sera décerné à l'occasion du congrès annuel.

Toute correspondance à ce sujet peut être adressée au soussigné.

J. R. Kinney
Secrétaire exécutif
360 avenue Bronson
Ottawa, Ontario
K1R 6J3