

ARTICLES ORIGINAUX

Bilan de cinq années de détection des taurillons infectés de manière persistante par le virus BVD au centre de sélection bovine de Ciney

WAXWEILER S.*, KARELLE - BUI THI L.*, BOULANGER D.*, MIGNON B.*, ERNST E.*, DETAL G.**, BOONEN F.**,
PASTORET P.-P.*

* Service de virologie-immunologie
Faculté de Médecine Vétérinaire
Institut de chimie - Bât. B6
Sart-Tilman - 4000 Liège

** Centre de sélection bovine de Ciney
1, rue des Champs Elysées
5590 Ciney

Manuscrit déposé le 13/11/1991.

INTRODUCTION

Le virus BVD-MD, responsable de la diarrhée virale bovine (Bovine Viral Diarrhoea, BVD) et de la maladie des muqueuses (Mucosal Disease, MD) est très répandu en Europe et en Amérique du Nord, où 36 à 88 % des bovins possèdent des anticorps spécifiques de ce virus (PASTORET *et al.*, 1986).

Le virus BVD-MD peut se transmettre horizontalement ou de façon épigénétique (transplacentaire). Au sein d'un rassemblement de taurillons à l'engrais, le seul mode de transmission possible est évidemment horizontal: le virus pénètre au niveau de l'appareil respiratoire, de l'appareil digestif ou de la conjonctive. La maladie aiguë qui suit la primo-infection d'un animal sensible se traduit par une période d'in-

cube de 5 à 7 jours suivie d'une hyperthermie transitoire (DUFFEL et HARKNESS, 1985) et d'une virémie; le virus va ensuite coloniser les organes-cibles, tels que la muqueuse digestive. Chez la majorité des individus, l'infection est subclinique, mais l'immunosuppression transitoire qui en découle pourrait potentialiser l'action d'autres agents pathogènes (PASTORET *et al.*, 1986).

La faculté d'établir des infections persistantes (par passage transplacentaire) est une propriété importante des pestivirus. La prévalence des animaux infectés de manière persistante est relativement faible (BOLIN *et al.*, 1985; PETERS *et al.*, 1987; WAXWEILER *et al.*, 1989). Ces animaux peuvent rester en bonne santé apparente pendant plu-

RESUME

Des prises de sang ont été régulièrement effectuées pendant cinq ans chez les taurillons du centre de sélection bovine de Ciney, afin d'y détecter les animaux infectés de manière persistante par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD).

La prévalence des animaux infectés de manière persistante était comparable à celle généralement observée dans les populations bovines, et était similaire chaque année.

Certains prélèvements ont été analysés par isolement viral en culture de cellules, la méthode de référence, et par ELISA sandwich; les résultats obtenus par les deux types de tests concordaient parfaitement.

sieurs années (BROWNLIE *et al.*, 1987; CORIA et Mc CLURKIN, 1978) et jouent un rôle essentiel dans l'épidémiologie de la maladie. Ils représentent en effet une source permanente de virus pour leurs contemporains et leur présence au sein des troupeaux peut entraîner des pertes financières considérables (HARKNESS, 1987). C'est pourquoi des directives ont été édictées par le journal officiel des Communautés Européennes, fixant les exigences de police sanitaire applicables aux échanges intracommunautaires et aux importations de sperme congelé d'animaux de l'espèce bovine (PASTORET *et al.*, 1989). Ces directives comportent des implications qui touchent directement le centre de sélection bovine de Ciney et les centres d'insémination qui en dépendent. Elles concernent, entre autres maladies, l'infec-

tion par le virus BVD-MD, pour laquelle aucune mesure n'était encore prise: les animaux infectés de manière persistante devront être abattus, ou retournés à l'éleveur après castration.

Depuis 1987, tous les taurillons du centre de sélection bovine de Ciney sont soumis à un test de détection du virus BVD dans les leucocytes sanguins, afin d'identifier les animaux infectés de manière persistante. Par ailleurs, la circulation de souches non cytopathogènes du virus BVD parmi ces animaux a déjà été observée au cours des années 1987, 1988 et 1989 (WAXWEILER *et al.*, 1989).

La méthode classique de détection des animaux infectés de manière persistante consiste dans l'amplification en culture de cellules du virus présent dans les leucocytes des animaux, suivie d'un test d'immunofluorescence indirecte. Cette technique étant longue et coûteuse, un test immunoenzymatique (ELISA sandwich) a été mis au point par MIGNON *et al.* (1991). La détection du virus BVD en culture de cellules représente cependant la méthode légale établie en accord avec les directives de la Commission des Communautés Européennes, elle est donc systématiquement employée pour l'identification des animaux infectés de manière persistante par le virus BVD. Par ailleurs, elle constitue la méthode de référence à laquelle se trouve confronté l'ELISA, dont la sensibilité et la spécificité sont actuellement évaluées sur un grand nombre d'échantillons; après validation, l'ELISA pourrait donc remplacer la détection virale en culture de cellules pour le dépistage des animaux infectés de manière persistante par le virus BVD.

Certains prélèvements de sang effectués au cours de l'année 1991 ont été analysés par la méthode de référence et par ELISA; les résultats obtenus par ces deux techniques ont été comparés. D'autre part, le bilan de cinq années de détection du virus BVD parmi les lots de taurillons du centre de sélection bovine de Ciney sera présenté dans cet article.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Le centre de sélection bovine de Ciney héberge des taurillons soumis au test de performances avant d'être classés; ces animaux appartiennent en majorité à la race Blanc Bleu Belge et sont de provenances diverses.

Les taurillons arrivent au centre à l'âge de 4 mois, mais la première prise de sang n'est réalisée chez ces animaux qu'à partir de l'âge de 6 mois. Ils ne subissent au centre aucune vaccination contre le virus BVD, mais peuvent avoir été vaccinés à la ferme d'origine.

En 1987, 100 taurillons et, en 1988, 277 animaux ont subi 2 prises de sang à un mois d'intervalle. En 1989, des prises de sang ont été effectuées chez 331 taurillons; en 1990, chez 296 animaux et, en 1991, chez 200 animaux; seuls les animaux positifs lors du premier prélèvement ont subi un deuxième test de détection.

Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés sous héparine-lithium. Tous les échantillons ont été testés par immunofluorescence indirecte; le sang a été centrifugé 30 min à 900 g et le «buffy coat» (zone de séparation entre le plasma et les érythrocytes) a été prélevé et congelé à -80°C . Certains prélèvements effectués en 1991 ont également été testés par ELISA; 1 ml de sang a alors été additionné de 10 μl de NP40, incubé 10 min à température ambiante (T.A.), centrifugé 5 min à 10000 g, pour conserver le surnageant comme antigène à -80°C .

Anticorps

Des anticorps monoclonaux produits contre la souche NY-1 non cytopathogène du virus BVD (anticorps NY-6, 8, 9, 10, 15) et contre la souche OSLOSS cytopathogène (OSc-22, 23 et 25) ont été utilisés. Les anticorps NY-9 et NY-10 reconnaissent la glycoprotéine de 53kd, tandis que les anticorps NY-6, 8 et 15 sont spécifiques de la glycoprotéine de 48kd; les anticorps produits contre la souche OSLOSS cytopathogène précipitent la protéine de 80kd et son précurseur de 120kd (BOULANGER *et al.*, 1991).

Les anticorps monoclonaux ont été produits *in vivo* et *in vitro*. Le liquide d'ascite obtenu à partir des anticorps NY-6,

8, 15 et OSc-22, 23 a été concentré par précipitation au sulfate ammonique à saturation et purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de Protéine-A sépharose (Pharmacia). Les anticorps purifiés ont ensuite été couplés à la biotine (Calbiochem) selon la méthode de O'SHANNESY (1990) et utilisés comme réactifs pour l'ELISA.

Analyses effectuées

Détection du virus BVD dans le «buffy coat» par isolement viral en culture de cellules

La détection du virus BVD dans le sang de tous les animaux a été réalisée par isolement viral en culture de cellules, selon une procédure empruntée à NETTLETON et collaborateurs (1985) et modifiée par WAXWEILER *et al.* (1989).

Brièvement, des cellules MDBK (Madin Darby Bovine Kidney, fournies par l'ATCC) confluentes en plaques de 24 cupules ont été infectées à l'aide du «buffy coat» des animaux. Les plaques ont été incubées pendant une semaine à 37°C -5 % CO_2 -100 % HR, puis soumises à un cycle de congélation-décongélation. Le surnageant issu de ces plaques a ensuite été inoculé à des cellules MDBK confluentes en microplaques de 96 cupules. Après 3 jours d'incubation, les microplaques ont été fixées à l'acétone 95 %-5 % H_2O . Un test d'immunofluorescence indirecte a alors été réalisé à l'aide d'un mélange d'anticorps monoclonaux (surnageant d'hybridomes) dirigés contre les protéines de 48kd (NY-6 et 8), 53kd (NY-9 et 10) et 80/120kd (OSc-25) du virus BVD, suivi d'un sérum de lapin anti-immunoglobulines de souris couplé à la fluorescéine (RAM-Fitc, Prosan).

ELISA sandwich

Certains échantillons ont également été analysés par un ELISA sandwich, selon le protocole décrit par MIGNON *et al.* (1991).

Une combinaison d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine de 48kd et contre la protéine de 80/120kd du virus BVD a servi à la détection de l'antigène. Brièvement, un mélange d'anticorps capteurs (NY-8, 15 et OSc-22) a été incubé une nuit à 4°C ; 100 μl /puits de l'antigène ont été incubés pendant 1h à 37°C . Un mélange d'anticorps révélateurs (NY-6 et OSc-23), couplés à la biotine, a alors été incubé pendant 1h à T.A. Cent μl /puits de streptavidine liée

à la peroxydase (Amersham) et diluée 1/400 dans du PBS additionné de 0,02 % de Tween 80 (PBS-Tween) ont alors été déposés; le chromogène employé était l'ABTS (Boehringer Mannheim). Entre chaque étape, les plaques ont été lavées 5 fois au PBS-Tween. L'absorbance a été mesurée après 8h, à 414 nm, à l'aide d'un Titertek Multiscan.

Analyse statistique des résultats

Les prévalences d'animaux infectés de manière persistante observées au cours des 5 années consécutives ont été comparées par un test de χ^2 .

RESULTATS

Résultats des tests réalisés par isolement viral en culture de cellules

En 1987, 100 taurillons et, en 1988, 277 animaux ont subi 2 tests de détection à un mois d'intervalle. En 1989, 331 taureaux; en 1990, 296 et en 1991, 200 animaux ont été analysés.

Le tableau 1 reprend, année par année, les résultats de chaque prise de sang; les animaux positifs lors des deux prélèvements étaient considérés comme infectés de manière persistante.

L'évolution du statut des animaux entre les deux prélèvements successifs sont exposés dans le tableau 2. La majorité (plus de 90 %) des animaux étaient négatifs (non virémiques) lors des deux prises de sang. Certains animaux, positifs lors du premier prélèvement, sont devenus négatifs par la suite. Les animaux infectés de manière persistante représentaient de 0,60 à 0,80 % des taurillons.

Comparaison des résultats obtenus par isolement viral en culture de cellules et par ELISA.

Cent onze prélèvements réalisés en 1991 ont été testés par isolement viral en culture de cellules et par ELISA. Les résultats obtenus par ces deux types de tests concordent parfaitement: un animal s'est révélé positif lors de deux prélèvements successifs, tandis que tous les autres étaient négatifs.

TABLEAU 1
Résultats des tests effectués lors de chaque prise de sang pour les différentes années consécutives

Année	Total	+ à la 1ère PS		+ à la 2ème PS		+ aux 2 PS	
			%		%		%
1987	100	1	1	1	1	1	1
1988	277	2	0,7	2	0,7	2	0,7
1989	331	8	2,4	2	0,6	2	0,6
1990	296	4	1,4	2	0,7	2	0,7
1991	200	1	0,5	1	0,5	1	0,5

$K^2 = 0,285$

Total = nombre total d'animaux
PS = prise de sang

TABLEAU 2
Evolution du statut des animaux d'une prise de sang à l'autre

Nombre total d'animaux	Résultats des tests		Nombre d'animaux	%
	1ère PS	2ème PS		
1987-1988	—	—	374	99,2
377 animaux	—	+	0	0
	+	—	0	0
	+	+	3	0,8
1989-1990-	—	NT	814	98,4
1991	+	—	8	1
827 animaux	+	+	5	0,6

PS = prise de sang
NT = non testé

Comparaison des prévalences d'animaux infectés de manière persistante

Les pourcentages d'animaux infectés de manière persistante observés au cours des 5 années ont été comparés par un test de χ^2 . L'hypothèse de départ était que la prévalence des animaux infectés de manière persistante ne variait pas d'une année à l'autre; la valeur du χ^2 était de 0,285 (tableau 1) et cette hypothèse pouvait donc être acceptée.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Depuis 1987, des prises de sang sont effectuées au centre de sélection bovine de Ciney, afin de détecter les animaux infectés de manière persistante par le virus BVD, ce test de détection étant rendu obligatoire, au niveau des centres d'insémination artificielle, par une directive de

la Commission des Communautés Européennes (PASTORET *et al.*, 1989).

Parmi les taurillons du test de performances, les pourcentages d'animaux infectés de manière persistante observés en 1990 et en 1991 étaient comparables aux valeurs enregistrées au cours des années précédentes (tableau 1) et la prévalence obtenue concordait avec les résultats d'autres auteurs (BOLIN *et al.*, 1985; PETERS *et al.*, 1987). Malgré cette faible proportion (0,5 à 1 %) d'animaux infectés de manière persistante, le virus BVD est particulièrement répandu dans les populations bovines, puisque 70 à 80 % des animaux possèdent des anticorps neutralisant le virus BVD (BOLIN *et al.*, 1985; PASTORET *et al.*, 1986; PETERS *et al.*, 1987; WAXWEILER *et al.*, 1989). Cette prévalence élevée d'animaux présentant des anticorps neutralisants n'empêche cependant pas le virus de circuler

parmi les animaux, puisque 8 taurillons parmi les 827 animaux testés de 1989 à 1991 (0,97 %) présentaient une virémie à la première prise de sang, alors qu'ils se sont révélés négatifs lors de la seconde (tableau 2). Ces observations, réalisées en 1989 et en 1990 (tableau 1), démontrent l'importance d'un deuxième examen, afin de confirmer la valeur d'un premier test de détection positif; en effet, seuls les animaux virémiques lors des deux prélèvements successifs, réalisés à un mois d'intervalle, sont considérés comme infectés de manière persistante. Certains animaux n'étaient donc pas réellement infectés de manière persistante, mais devaient se trouver en état de virémie primaire suite à une transmission horizontale du virus à partir de quelques animaux réellement infectés de manière persistante, ou également en cours d'infection primaire.

Les prélèvements sanguins ne sont réalisés qu'à partir de l'âge de 6 mois, afin d'éviter une interférence éventuelle des anticorps colostraux et l'obtention de résultats faussement négatifs; une telle situation a en effet déjà été observée chez les veaux soumis au test de la descendance au centre de sélection bovine de Ciney (WAXWEILER *et al.*, 1989).

Par ailleurs, certains prélèvements effectués en 1991 ont été testés par isolement viral en culture de cellules, la méthode de référence, et par ELISA, dans le cadre de la validation du test ELISA sandwich mis au point par MIGNON *et al.* (1991). Les résultats des deux types de tests concordaient parfaitement. L'ELISA, plus rapide et plus sensible que la méthode de référence, devrait donc être appelé à remplacer cette dernière dans les plus brefs délais.

L'impact économique de l'infection par le virus BVD est tel qu'il est primordial d'éviter la présence d'animaux infectés de manière persistante dans les troupeaux; la détection et l'élimination subséquente des animaux infectés de manière persistante demeure donc la meilleure approche dans la lutte contre l'affection. Les tests de diagnostic utilisés, basés sur l'emploi d'anticorps monoclonaux, sont tout à fait fiables et reproductibles, et jouent un rôle essentiel dans la prophylaxie de la maladie.

REMERCIEMENTS

Nos plus vifs remerciements s'adressent à Maria LONCAR pour son excellente collaboration technique;

ainsi qu'au Dr Etienne THIRY pour sa lecture critique du manuscrit.

Ce travail a été réalisé sous les auspices de l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IR-SIA).

SUMMARY

Five years detection of young bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in selection station of Ciney (Belgium).

Since 1987, blood was regularly collected from young bulls gathered in a selection station of Belgian Blue Breed, in order to identify cattle persistently infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV).

Percentages of persistently infected animals were similar to those usually observed in bovine populations and remained identical through the different years.

Some samples were analyzed by virus isolation in cell culture, the reference test, and by ELISA; results obtained by both assays were perfectly similar.

BIBLIOGRAPHIE

- BOLIN S.R., Mc CLURKIN A.W., CORIA M.F. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 2385-2387.
- BOULANGER D., WAXWEILER S., KARELLE L., LONCAR M., MIGNON B., DUBUISSON J., THIRY E., PASTORET P.-P. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J. Gen. Virol.*, 1991, **72**, 1195-1198.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOWARD C.J., POCOCK D.H. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vet.*, 1987, **18**, 157-166.
- CORIA M.F., Mc CLURKIN A.W. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J.A.V.M.A.*, 1978, **172**, 449-451.
- DUFFEL S.J., HARKNESS J.W. Bovine virus diarrhoea mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.*, 1985, **117**, 240-245.
- HARKNESS J.W. The control of bovine viral diarrhoea virus infection. *Ann. Rech. Vet.*, 1987, **18**, 167-174.
- MIGNON B., DUBUISSON J., BARANOWSKI E., KOROMYSLOV I., ERNST E., BOULANGER D., WAXWEILER S., PASTORET P.-P. A monoclonal ELISA for Bovine Viral Diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Methods*, 1991, in press.
- NETTLETON P.F., BARLOW R.M., GARDINER A.C., PASTORET P.-P., THIRY E. La pathogénie et l'épidémiologie de l'infection par le virus BVD. *Ann. Méd. Vét.*, 1985, **129**, 88-108.
- O'SHANNESY D. Antibodies biotinylated via their sugar moieties. *Meth. Enz.*, 1990, **184**, 162-166.
- PASTORET P.-P., THIRY E., SCHWERS A., DUBUISSON J. Epidémiologie et physiopathologie de l'infection par le virus BVD. In: Pestiviroses des ovins et des bovins. Société française de buiatrie, Paris 6-7 novembre 1986.
- PASTORET P.-P., DETAL G., DIVE M., WAXWEILER S., THIRY E., WELLEMANS G., MARCOURT J., MAGONET P., DERNELLE E. Mesures à prendre au centre de sélection bovine de Ciney en vue de répondre aux nouvelles normes sanitaires imposées par la Commission des Communautés Européennes. *Ann. Méd. Vét.*, 1989, **133**, 247-256.
- PETERS W., GREISER-WILKE I., MOENNIG V., LIESS B. Incidence and impact of persistent infections with BVDV in the field. In: Pestivirus infections of ruminants. J.W. HARKNESS, éditeur, Office for Official Publications of the European Communities, 1987, 133-145.
- WAXWEILER S., KARELLE-BUI THI L., SNEYERS M., LAMBERT A.-F., DELCHAMBRE M., DUBUISSON J., THIRY E., ANTOINE H., DIVE M., DETAL G., PASTORET P.-P. Circulation de souches non cytopathogènes du virus BVD dans des lots de taurillons. *Ann. Méd. Vét.*, 1989, **133**, 681-690.