

Etude sur l'excrétion et la réexcrétion spontanée de deux souches vaccinales du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovine herpesvirus 1*) par des veaux sains maintenus en station de sélection

E. THIRY*, B. BROCHIER*, B. LANSIVAL**, G. HANTON*,
G. DERBOVEN*, P.-P. PASTORET*, H. ANTOINE**

* Service de Virologie,
Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège,
Rue des Vétérinaires 45, B-1070 Bruxelles, Belgique.

** Laboratoire de Virologie et Immunologie,
Centre d'Economie rurale,
Rue du Carmel 1, B-5406 Marloie, Belgique.

RESUME

Vingt-huit veaux mâles, de race Blanc-Bleu Belge, maintenus en station de sélection, ont été vaccinés selon les prescriptions de la firme, à l'aide de souches vaccinales du *Bovine herpesvirus 1* (BHV 1 ; virus IBR) : la souche ts RLB 106 (Trachérhine®, Smith-Kline, RIT) ou la souche IBR-IPV (Bayer). Ces bovins ont subi une seconde vaccination un mois plus tard, soit avec la même souche vaccinale, soit avec une souche différente de celle ayant servi à la première vaccination.

L'excrétion du virus vaccinal a été étudiée dans les différents cas : elle est faible et elle n'a pas pu être mise en évidence chez les veaux revaccinés à l'aide d'une souche différente de celle utilisée pour vacciner la première fois. L'état immunitaire des animaux a été suivi par séroneutralisation. Un grand

Manuscrit déposé le 28.03.1983.

Travail subventionné par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA) et le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS).

nombre d'animaux (10 sur 28) n'ont pas présenté de séroconversion après vaccination et revaccination.

Des prises régulières d'écouvillons nasaux jusqu'au 9^e mois après la vaccination n'ont pas permis de mettre en évidence une réexcrétion spontanée de virus vaccinal. Trois mois après la seconde vaccination, un seul bovin possédait encore des anticorps neutralisant le BHV 1. Ensuite, jusqu'au 9^e mois après la première vaccination, toutes les séroneutralisations sont restées négatives.

INTRODUCTION

La vaccination à l'aide de souches atténuées du *Bovine herpesvirus 1* (BHV 1 ; virus IBR) est une mesure prophylactique efficace dans la lutte contre la rhinotrachéite infectieuse bovine. Chez des bovins vaccinés, subissant une infection expérimentale par une souche sauvage, la vaccination prévient l'apparition de la maladie clinique ; cependant, elle n'empêche pas l'excrétion du virus sauvage (Zygraïch *et al.*, 1974 ; Nettleton et Sharp, 1980 ; Pastoret *et al.*, 1980 ; Frerichs *et al.*, 1982 ; Lucas *et al.*, 1982).

L'injection de dexaméthasone à un bovin vacciné à l'aide d'une souche atténuée de BHV 1 provoque la réactivation et la réexcrétion du virus vaccinal : celui-ci se maintient donc à l'état latent chez le bovin. De plus, la vaccination par une souche atténuée ne prévient pas l'installation à l'état latent d'une souche sauvage chez le bovin vacciné (Nettleton et Sharp, 1980 ; Pastoret *et al.*, 1982).

L'excrétion des souches vaccinales de BHV 1, et principalement de la souche thermosensible ts RLB 106, a déjà été étudiée de manière expérimentale (Zygraïch *et al.*, 1974 ; Nettleton et Sharp, 1980 ; Frerichs *et al.*, 1982), mais dans

les conditions de la pratique, peu de résultats sont disponibles (Straub, 1977 ; Lucas *et al.*, 1982).

Cet article décrit l'excrétion de deux souches vaccinales de BHV 1 chez des veaux maintenus en station de sélection : la souche ts RLB 106 thermosensible, dont la température optimale de multiplication est 35 °C et la température restrictive, 40 °C, et la souche IBR-IPV de Bayer, atténuée de manière conventionnelle, qui se multiplie à 35, 37 et 40 °C.

Il étudie aussi la réexcrétion spontanée du virus vaccinal durant 9 mois après la vaccination. L'état immunitaire des animaux est évalué par le titrage des anticorps neutralisant le BHV 1.

MATERIEL ET METHODES

Souches virales et vaccination

La souche thermosensible (ts RLB 106 ; Trachéhrine®, Smith-Kline, RIT) (Zygraïch *et al.*, 1974) et la souche vaccinale IBR-IPV (Bayer) ont servi à vacciner les animaux. Les bovins, âgés de 3 mois, ont été vaccinés par voie intranasale selon les prescriptions de la firme. Le jour de la vaccination est considéré comme jour 0. Les veaux ont été revaccinés au jour 27, selon le protocole suivant :

	<i>Veaux n°</i>	<i>Jour 0</i>	<i>Jour 27</i>
Groupe 1	1 à 7	Trachérhine	IBR-IPV
Groupe 2	8 à 14	Trachérhine	Trachérhine
Groupe 3	15 à 21	IBR-IPV	Trachérhine
Groupe 4	22 à 28	IBR-IPV	IBR-IPV

La souche internationale de référence IBR/Los Angeles (IBR/LA) est utilisée pour la séroneutralisation.

Animaux

Vingt-huit veaux mâles, de race Blanc-Bleu Belge, âgés de 3 mois au début de l'expérience, sont utilisés. Au jour 0, ils n'excrètent pas le BHV 1 (tests utilisés : infection de culture cellulaire par les écouvillons nasaux ; immunofluorescence directe sur culture infectée). Au jour 0, les veaux 12, 14 et 24 possèdent des anticorps neutralisant le BHV 1 (titres : 2 ou < 2). Le veau 14 est mort le jour 7 et a été remplacé, sous le même numéro, par un veau vacciné de la même manière, mais dont l'état immunitaire initial et le taux d'excrétion de virus vaccinal sont inconnus. Le veau 19 est également mort en cours d'expérience et n'a pas été remplacé.

Prélèvements

Les veaux ont subi des écouvillonnages nasaux aux jours 0 (jour de la vaccination), 1, 4, 7, 27 (jour de la seconde vaccination), 28, 31 et 34. Des prélèvements nasaux ont été régulièrement effectués aux jours 77, 112, 167, 216 et 244. Les écouvillons sont maintenus à 4 °C et leur infectivité mesurée le lendemain des prélèvements, par titrage des particules infectieuses. Du sérum est prélevé aux jours 0, 27, 77, 112, 167, 216 et 244. Aucun prélèvement n'a pu être réalisé au jour 244 sur les bovins 15 à 18 et 21.

Titrage des particules infectieuses

Les particules infectieuses de BHV 1 sont titrées par une méthode d'obtention de plages sous antisérum. Les cellules GBK (Georgia Bovine Kidney) confluentes sont entretenues comme précédemment décrit (Thiry

et al., 1981), dans des microplaques de 96 puits. Chaque puits est inoculé avec 50 µl d'une dilution de raison 10 de la suspension virale à tester. Après une heure d'adsorption, les cellules sont recouvertes de MEM dépourvu de sérum de veau foetal, contenant 5 % d'un sérum bovin (titre en anticorps neutralisant le BHV 1 : 4). Les titrages sont réalisés en double et chaque échantillon est titré en parallèle à 35 et 40 °C. Après 3 jours, les cellules sont fixées et colorées par une solution hydro-alcoolique de Cristal Violet. Les plages sont dénombrées au microscope inversé.

Séronutralisation

Les séronutralisations sont réalisées par microméthode sur cellules GBK, selon la technique de Jenny et Wessman (1973). Le titre en anticorps neutralisant le BHV 1 représente la plus grande dilution d'ordre 2 du sérum testé neutralisant 50 % de l'effet cytopathogène induit par 100 unités formant plages (ufp) de la souche IBR/LA. Un animal est considéré positif en séronutralisation dès qu'une réduction importante de l'effet cytopathogène est décelée à la dilution la plus faible (< 2).

Les séronutralisations ont été pratiquées en deux fois : la première comportait les sérum prélevés aux jours 0, 27 et 77 ; la seconde, les sérum prélevés aux jours 112, 167, 216 et 244.

RESULTATS

Excrétion virale

Les taux moyens d'excrétion virale des deux souches vaccinales de BHV 1 sont présentés dans la figure 1. Chez 4 veaux sur 14 vaccinés à l'aide de la souche IBR-IPV, aucune excrétion n'est décelée. Un seul de ces veaux (n° 24) possédait

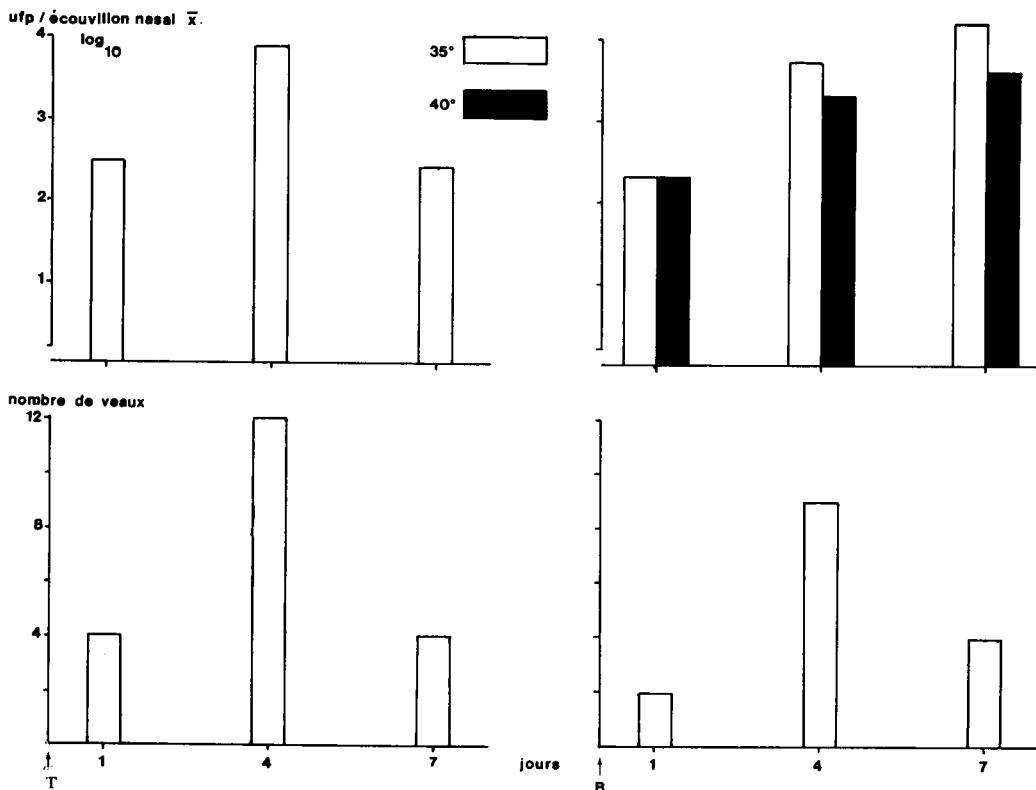


Fig. 1. — Evolution de l'excrétion des souches vaccinales de BHV 1 et du nombre d'animaux présentant une excrétion, après la première vaccination ; les moyennes sont exprimées par rapport au nombre d'animaux qui excrètent.

Fig. 1a. — Après vaccination à l'aide de la souche ts RLB 106 (1 veau sur 14 n'a jamais montré d'excrétion virale).

Fig. 1b. — Après vaccination à l'aide de la souche IBR-IPV (4 veaux sur 14 n'ont jamais montré d'excrétion virale).

T : vaccin Trachéhine® (souche ts RLB 106).
B : vaccin IBR-IPV de Bayer.

au jour 0 des anticorps neutralisant le BHV 1 (titre : 2). Parmi les 14 veaux vaccinés à l'aide de la souche ts RLB 106, un seul (n° 14) n'a pas montré d'excrétion virale décelable : il possédait des anticorps neutralisants spécifiques (titre : 2) et est mort le jour 7 des conséquences d'une hernie abdominale.

Les veaux revaccinés par une souche différente de celle ayant servi à vacciner la première fois n'ont présenté aucune

excrétion virale décelable. Parmi les veaux vaccinés une seconde fois avec la souche ts RLB 106, aucune excrétion n'est détectée chez 4 animaux sur 7. Dans le deuxième groupe, vacciné deux fois avec la souche IBR-IPV, 3 bovins sur 7 n'ont pas montré d'excrétion virale. L'excrétion virale a été, dans ce cas, positive seulement à 35 °C, bien que ces animaux aient reçu uniquement la souche IBR-IPV. La figure 2 expose les résultats obtenus après revaccination.

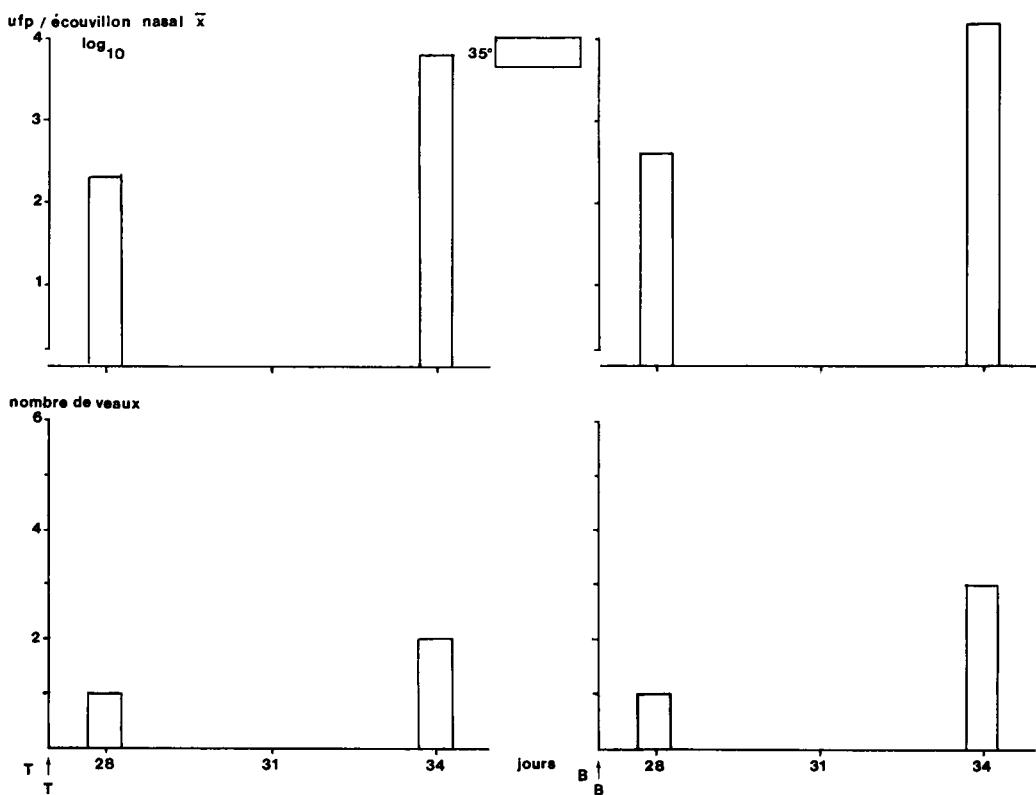


Fig. 2. — Evolution de l'excrétion des souches vaccinales de BHV 1 et du nombre de veaux chez qui l'excrétion est décelée après la seconde vaccination ; les moyennes sont exprimées par rapport au nombre de veaux qui excrètent.

Fig. 2a. — Veaux vaccinés à l'aide de la souche ts RLB 106 aux jours 0 et 27 (4 veaux sur 7 n'ont pas présenté d'excrétion virale).

Les animaux vaccinés à l'aide d'une autre souche que celle utilisée pour la première vaccination n'ont pas montré d'excrétion virale.

T : vaccin Trachérhine® (souche ts RLB 106).

Fig. 2b. — Veaux vaccinés à l'aide de la souche IBR-IPV aux jours 0 et 27 (3 veaux sur 7 n'ont pas montré d'excrétion virale).

B : vaccin IBR-IPV de Bayer.

Aucune excrétion virale n'a été mise en évidence chez les différents bovins testés, lors du titrage des particules infectieuses contenues dans les écouvillons prélevés aux jours 77, 112, 167, 216 et 244.

Séronutralisation

La figure 3 donne, pour chaque groupe de bovins, et en fonction du temps, le

nombre d'animaux possédant des anticorps neutralisant le BHV 1. Parmi ces bovins, 10 sur 28 n'ont jamais montré de séroconversion : 1 dans le groupe 1 ; 3 dans le groupe 2 ; 4 dans le groupe 3 ; 2 dans le groupe 4. Les titres en anticorps neutralisants étaient faibles : de < 2 à 4, selon l'animal, avec un seul titre égal à 8 (veau n° 20). Au jour 112, soit 4 mois après la première vaccination et 3 mois après la seconde, un seul veau

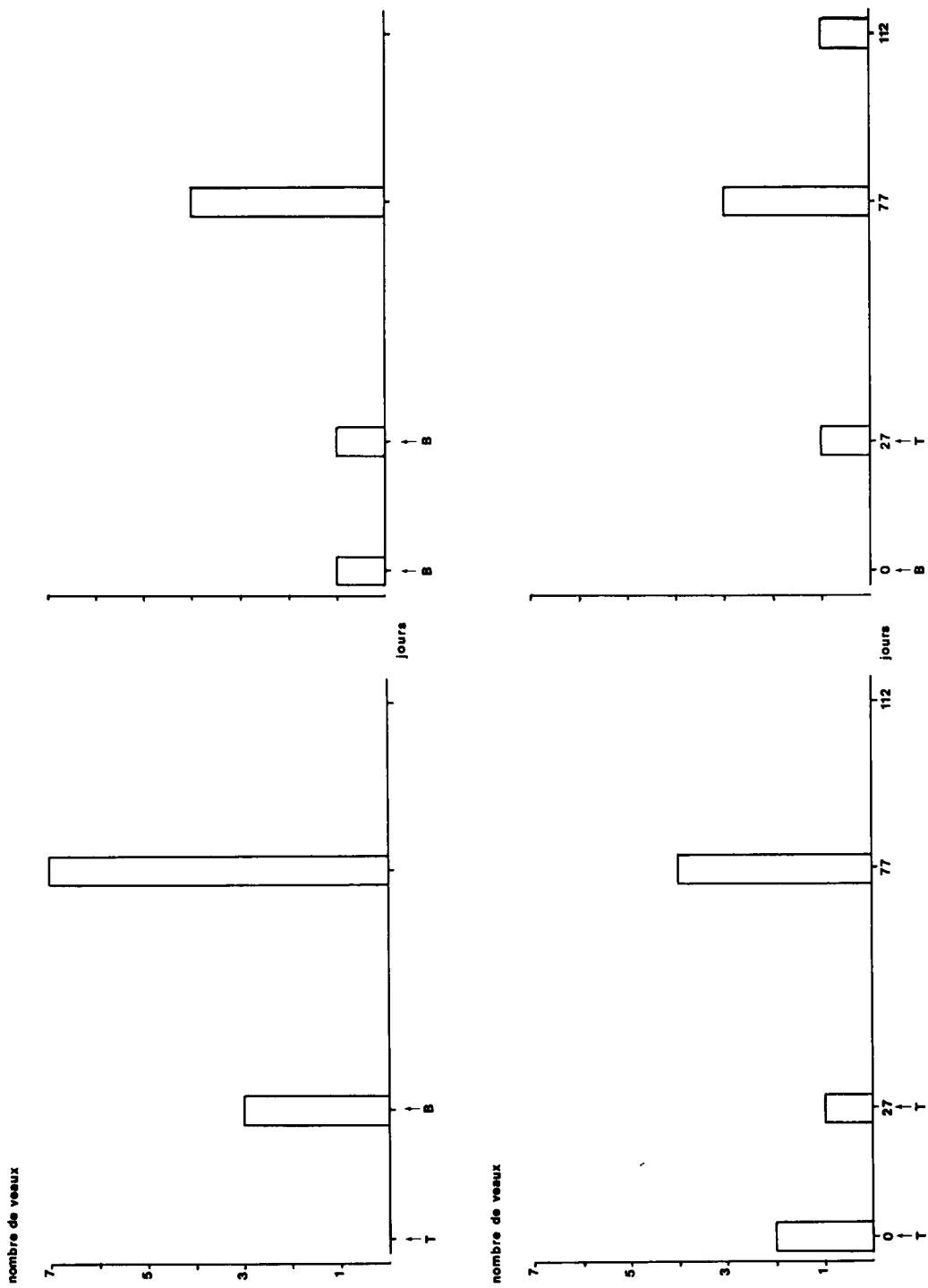


Fig. 3. — Evolution du nombre d'animaux qui possèdent des anticorps neutralisant le BHV 1 (titres de < 2 à 8); 10 veaux sur 28 n'ont jamais présenté de séroconversion.

T : vaccin Trachérhine® (souche ts RLB 106). B : vaccin IBR-IPV de Bayer.

possédait encore des anticorps neutralisant le BHV 1 (titre : 4) (fig. 3). Ensuite, jusqu'au 9^e mois après la première vaccination, toutes les séroneutralisations ont été négatives.

DISCUSSION

Peu de bovins ont présenté une séroconversion envers le BHV 1 après vaccination par la souche ts RLB 106 ou la souche IBR-IPV (fig. 3). Ce nombre a augmenté après la deuxième vaccination (fig. 3), mais les titres en anticorps neutralisants sont restés peu élevés (titres : < 2 à 4). Ces résultats concordent avec ceux décrits précédemment (Zygraïch *et al.*, 1974 ; Nettleton et Sharp, 1980 ; Lucas *et al.*, 1982).

Trois mois après la seconde vaccination, un seul bovin possédait encore des anticorps neutralisants ; ensuite, jusqu'au 9^e mois après la première vaccination, toutes les séroneutralisations sont restées négatives (fig. 3). Des bovins vaccinés à l'aide d'une de ces deux souches vaccinales ne peuvent donc plus être repérés par une méthode sérologique comme la séroneutralisation, trois à cinq mois après la vaccination. Ce résultat a d'importantes conséquences épidémiologiques, puisque ces bovins sont susceptibles d'être porteurs latents du virus vaccinal (Pastoret *et al.*, 1983), sans être repérés par ce test sérologique.

Malgré cette faible réponse en séroneutralisation, la vaccination par une souche atténuee confère une protection efficace aux bovins infectés par une souche sauvage de BHV 1 : les signes cliniques sont prévenus et l'excrétion de la souche sauvage est diminuée (Straub *et al.*, 1973 ; Zygraïch *et al.*, 1974 ; Straub, 1977 ; Nettleton et Sharp, 1980 ; Freerichs *et al.*, 1982 ; Zuffa *et al.*, 1982).

Puisque les taux d'anticorps neutralisants sont faibles ou inexistantes après vaccination et revaccination, d'autres mécanismes immunitaires doivent être impliqués dans la réponse développée par le bovin vacciné lorsqu'il est infecté par une souche sauvage. L'efficacité de cette défense dépend du contrôle de la propagation du BHV 1 de cellule à cellule, par les ponts intercellulaires : l'immunité à médiation cellulaire joue ici un rôle prépondérant. Gerber *et al.* (1978) montrent en effet que la vaccination, intranasale ou intramusculaire, à l'aide de souches de BHV 1 thermosensible ou atténuée de manière conventionnelle, stimule l'immunité à médiation cellulaire spécifique. La vaccination intranasale induit une meilleure protection locale, à la fois humorale et cellulaire. D'ailleurs, McKercher et Grenshaw (1971) constatent que les bovins vaccinés par voie intranasale présentent, après infection par une souche sauvage, des signes respiratoires antérieurs moins prononcés que ceux vaccinés par voie intramusculaire.

L'excrétion des deux souches vaccinales est faible et n'a pas été mise en évidence chez certains animaux (fig. 1). Lorsque des veaux ont été revaccinés par la souche utilisée pour la première vaccination, l'excrétion virale a été décelée chez plusieurs animaux ; par contre, après une seconde vaccination par une souche différente de celle ayant servi à la première vaccination, aucune excréption de virus vaccinal n'a été mise en évidence. Ce résultat doit être confirmé, car il pourrait représenter simplement un cas particulier de la situation qui prévaut après la seconde vaccination : la réduction du nombre d'animaux qui excrètent le virus vaccinal.

Les prélèvements pratiqués jusqu'au 9^e mois après la vaccination n'ont pas permis de détecter d'excrétion de virus vaccinal. Pourtant, la revaccination n'a pas hyperimmunisé les animaux ; en effet, sauf une exception, aucun animal ne possédait d'anticorps neutralisant le BHV 1 du jour 112 au jour 244. L'immunité humorale n'a donc pas pu contrôler un éventuel accès de réactivation virale. De plus, si un accès de réactivation virale était survenu chez un bovin en dehors des prélèvements réalisés, il aurait été décelé par la présence d'anticorps neutralisants induite par la réponse anamnestique que doit provoquer un premier accès (Pastoret *et al.*, 1979).

Dans nos conditions, le virus vaccinal est donc à tout le moins peu réexcrété. Selon les quelques cas rapportés, la réexcrétion nasale spontanée de BHV 1 est un événement rare (Snowdon, 1965 ; Bitsch, 1973). La réexcrétion spontanée au niveau génital de souches IPV est mieux détaillée : elle se produit régulièrement dans les deux sexes, même plus d'un an après l'infection (Snowdon, 1965 ; Bitsch, 1973 ; Köhler et Kubin, 1972). Les conditions d'élevage jouent certainement un grand rôle dans la fréquence des réexcrétions spontanées : des circonstances défavorables telles que transport, manipulations excessives, hygiène déficiente, ou des traitements aux cortisoniques (Wellemans *et al.*, 1976) sont autant d'occasions de réactivation et de réexcrétion virales. Lorsqu'elles sont absentes ou réduites au minimum, le BHV 1,

qu'il s'agisse d'une souche sauvage ou vaccinale, n'a pas la possibilité d'être réactivé.

Chez des bovins en bonne santé, maintenus dans une même exploitation, sans introduction d'animaux étrangers, les conséquences épidémiologiques de la réexcrétion spontanée de ces souches vaccinales sont donc restreintes : leur dissémination est pratiquement réduite aux jours qui suivent la vaccination et il n'existe que peu de chances d'excrétion de virus mutants, éventuellement pathogènes, obtenus de souches vaccinales, ou de virus formés par recombinaison entre une souche pathogène et une souche vaccinale.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement l'Ir. A. Stasse, Directeur du Centre de sélection bovine de Ciney et le Dr. M. Dive, de nous avoir permis de pratiquer dans les meilleures conditions les prélèvements sur les bovins du Centre de sélection, ainsi que M. Henrard (Bayer, Belgium) et le Dr. W. De Smedt (Smith-Kline, RIT), qui nous ont fourni les vaccins nécessaires à la réalisation de cette expérience.

Nous remercions également le Prof. R. Hanset et le Dr. C. Michaux, Chaire de Génétique, de l'aide qu'ils nous ont apportée, ainsi que V. Curvers, P. Evrard, A.F. Lambert, M. Maenhoudt, M. Pirak et C. Thiriart.

BIBLIOGRAPHIE

- BITSCHE V. Infectious bovine rhinotracheitis virus infection in bulls, with special reference to preputial infection. *Appl. Microbiol.*, 1973, **26**, 337.
FRERICHS G.N., WOODS S.B., LUCAS M.H., SANDS J.J. Safety and efficacy of

- live and inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Vet. Rec.*, 1982, **111**, 116.
GERBER D., MARRON A.E., KUCERA C.J. Local and systemic cellular and antibody immune responses of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccines adminis-

- tered intranasally or intramuscularly. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, **39**, 753.
- JENNY E.W., WEISSMAN S.J. Microtiter serology method for bovine virology : IBR NT (microtiter). In : « Serologic microtiter techniques for diagnostic virology », Diagnostic virology section, Veterinary services diagnostic laboratory, Animal, Plant and Health inspection service, Ames, Iowa, Feb. 12, 1973, p. 6.
- KÖHLER H., KUBIN G. Zur virologie, serologie und pathomorphologie des männlichen genitale nach natürlicher und experimenteller infektion mit dem IBR/IPV-virus. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 1972, **79**, 209.
- LUCAS M.H., ROBERTS D.H., SANDS J.J., WESTCOTT D.G.F. The use of infectious bovine rhinotracheitis vaccine in a commercial veal unit : antibody response and spread of virus. *Br. Vet. J.*, 1982, **138**, 23.
- McKERCHER D.G., CRENSHAW G.L. Comparative efficacy of intranasally and parenterally administered infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1971, **159**, 1362.
- NETTLETON P.F., SHARP J.M. Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination. *Vet. Rec.*, 1980, **107**, 379.
- PASTORET P.-P., AGUILAR-SETIÉN A., BURTONBOY G., MAGER J., JETTEUR P., SCHOENAERS F. Effect of repeated treatment with dexamethasone on the re-excretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. *Vet. Microbiol.*, 1979, **4**, 149.
- PASTORET P.-P., BABIUK L.A., MISRA V., GRIEBEL P. Reactivation of temperature-sensitive and non temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect. Immun.*, 1980, **29**, 483.
- PASTORET P.-P., THIRY E., VINDEVOGEL H. Problèmes liés à la latence lors de vaccination contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*). *Develop. biol. Standard.*, 1982, **52**, 455.
- PASTORET P.-P., THIRY E., BROCHIER B., DERBOVEN G., VINDEVOGEL H. The role of latency in the epizootiology of infectious bovine rhinotracheitis. CEE seminar on latent persistent herpesvirus infections in veterinary medicine, *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, 1983, sous presse.
- SNOWDON W.A. The IBR-IPV virus : reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.*, 1965, **41**, 135.
- STRAUB O.C., FRERKING H., KRAMER R. Impfung eines grossen Rinderbestandes gegen Bläschenausschlag und Rhinotracheitis. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 1973, **80**, 73.
- STRAUB O.C. Erfahrungen bei der Bekämpfung der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (IBR) und der infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IPV). *Tieraerztl. Umsch.*, 1977, **32**, 107.
- THIRY E., PASTORET P.-P., DESSY-DOIZÉ C., HANZEN C., CALBERG-BACQ C.M., DAGENAIS L., VINDEVOGEL H., ECTORS F. Réactivation d'un *herpesvirus* en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azospermie. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, 207.
- WELLEMANS G., DIVE M., STROBBE R. Isolement d'un virus IBR chez un veau après usage de cortisoniques. *Ann. Méd. Vét.*, 1976, **120**, 127.
- ZUFFA A., BRANYIK A., CERNIK K., SALAJ J. Protection against experimental infection of calves vaccinated intranasally by three attenuated strains of IBR virus. *Zentralbl. Vet. B*, 1982, **29**, 413.
- ZYGRAICH N., LOBMANN M., VASCO-BOINIC E., BERGE E., HUYGELEN C. In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.*, 1974, **16**, 328.

SUMMARY

Studies on excretion and spontaneous reexcretion of infectious bovine rhinotracheitis virus (*Bovine herpesvirus 1*) by healthy calves kept in selection station

Twenty-eight Belgian Blue bull calves, kept in selection station, were vaccinated in accordance with the

manufacturer's instructions, by the use of *Bovine herpesvirus 1* (BHV 1) vaccine strains : ts RLB 106 strain (Tracherine®, Smith-Kline, RIT) or IBR-IPV strain (Bayer). Cattle were vaccinated again one month later either with the same strain or with the other strain than that used for the primary vaccination.

In the different cases, the number of calves excreting vaccine virus was reduced ; even more, it was null in cattle vaccinated at the second time with a strain different from the previous one used for the primary vaccination. The immune status was estimated by seroneutralization. A large number of calves (10 out of 28) did not show any neutralizing antibody against BHV 1 after the two vaccinations.

Nasal swabs were regularly taken till 8 months after vaccination : spontaneous reexcretion of vaccine virus was never demonstrated. Three months after the second vaccination, only one calf still presented neutralizing antibodies against BHV 1 ; no positive neutralization was observed after.