

Effet de l'ozone sur le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*)

Y. ANCIAUX * **, E. THIRY *, P.-P. PASTORET *, J. LIGOT **

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

** Institut Supérieur Industriel de l'Etat,
Rue Saint-Victor, 3,
B-5200 Huy, Belgique.

RESUME

L'action de l'ozone a été étudiée pour deux souches de *Bovid herpesvirus 1* (BHV 1) : souche Los Angeles (LA) et souche vaccinale thermosensible (ts). L'ozone est produit par un ozoneur « Litha » type 2000.

L'ozone inactive rapidement le BHV 1 en suspension dans du PBS (Phosphate Buffered Saline, pH. 7,2). La souche ts est plus vite inactivée que la souche LA. L'effet augmente avec la concentration en ozone (0,25 à 1,6 mg/l).

Aucune réduction du nombre de plages n'est observée dans les cellules GBK (Georgia Bovine Kidney) infectées par le BHV 1 puis recouvertes de milieu contenant 1 % d'agarose et maintenues après la phase d'adsorption dans une atmosphère ozonée (air sec contenant 1 à 1,4 ppm d'ozone et 5 % de CO₂). L'extension de l'effet cytopathogène est cependant limitée en milieu liquide, probablement par inactiva-

tion des particules infectieuses en phase extracellulaire.

Les auteurs discutent de la portée éventuelle de leurs résultats dans les conditions d'une étable.

INTRODUCTION

Dans la lutte contre les maladies virales, la prophylaxie hygiénique joue un rôle important. Par exemple, l'emploi de substances antiseptiques pour la décontamination du milieu peut, en association à une vaccination efficace, limiter la fréquence de certaines maladies virales à transmission horizontale.

Grâce à son haut pouvoir oxydant, l'ozone est notamment un agent antiseptique ; à cet effet, il s'utilise couramment dans l'eau et l'air ambiant (Block, 1980). Il possède un effet virulicide très prononcé envers les *picornaviridae* (Foster et al., 1980 ; Walsh et al., 1980).

Il est également employé pour la désodorisation des locaux : en faible concentration dans l'air (0,1 ppm), l'ozone exerce une action efficace dans les porcheries, sans provoquer de lésions des voies respiratoires (Priem, 1974) ; cependant, dès 0,3 à 0,5 ppm, il manifeste un effet irritant pour le tractus respiratoire et les muqueuses oculaires (Erb, 1980). La concentration maximale tolérée dans l'atmosphère des locaux de travail est d'ailleurs de 0,1 ppm.

Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovine herpesvirus 1*, BHV 1) se transmet principalement par contact direct entre bovins (Pastoret, 1979) ou sous forme d'aérosol (Shroyer et Easterdar, 1968).

La présence, dans le milieu ambiant, d'un agent inactivant le BHV 1 à une

concentration non irritante pour les muqueuses serait de nature à restreindre l'émission et la transmission de ce virus. A ce titre, nous avons étudié *in vitro* l'effet de l'ozone sur le BHV 1.

MATERIEL ET METHODES

Souches virales et culture cellulaire

Les souches de BHV 1 utilisées sont la souche internationale de référence (Los Angeles, LA), aimablement fournie par le Prof. D.G. McKercher, Davies, U.S.A. et la souche vaccinale thermosensible (ts), aimablement fournie par la firme RIT (SKF), Genval (Zygraich et al., 1974).

Les cellules GBK (Georgia Bovine Kidney), aimablement fournies par le Prof. L.A. Babiuk, Saskatoon, Canada, sont cultivées comme précédemment décrit (Thiry et al., 1981). Les cellules sont placées en plaques de 24 puits de 1,6 cm de diamètre (Multi well, Falcon). Après infection, elles sont maintenues en milieu MEM (Minimum Essential Medium) dépourvu de sérum de veau foetal.

Production d'ozone

L'ozone est produit par un ozoneur de laboratoire (Litha type 2000) (Séverin, 1972), aimablement prêté par M. P. Anciaux. L'effluve électrique est obtenue dans un condensateur à diélectrique au mica plan, dont les armatures sont en acier inoxydable. L'effluveur est constitué de deux batteries de condensateurs enfermés dans une enceinte en plexiglas. La décharge électrique créatrice d'ozone est produite par une haute tension réglable par transformateur.

L'oxygène en bouteille employé pour la production d'ozone pénètre par le centre des plaques à effluve de la première batterie de condensateurs, se répand dans l'enceinte en plexiglas, puis s'enrichit en ozone en passant dans la deuxième batterie de condensateurs.

Mesure de la concentration en ozone

La concentration en ozone est déterminée par un comparateur colorimétrique (Hach, OZ 2) permettant la lecture de concentrations de 0 à 2 mg/l.

Le comparateur est prévu pour doser l'ozone dans l'eau. Un test comparatif a été préalablement effectué pour adapter l'appareil au dosage de l'ozone dans le PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,2). Après lecture rapide, aucune différence à l'échelle du comparateur colorimétrique n'est décelée entre dosage de l'ozone dans l'eau et le PBS.

L'ozone est dosé dans l'atmosphère par un Multi Gas Detector Dräger (modèle 21/31), pourvu de tubes réactifs « Ozone 0,05/a », gradués de 0,05 à 1,4 ppm.

Essai d'inactivation du BHV 1 par l'ozone

L'ozone barbote dans 104 ml de PBS. Après environ 30 minutes, la concentration de la solution en ozone est déterminée en prélevant 5 ml qui sont déposés dans le comparateur colorimétrique. Le barbotage de l'ozone est maintenu durant toute l'expérience, de façon à compenser l'autodestruction de l'ozone dans l'eau et à maintenir sa concentration relativement constante.

Malgré cette précaution, il peut arriver que la concentration en fin d'expérience (concentration résiduelle) soit inférieure à celle de départ.

Un ml de suspension de BHV 1 (souche LA, $2,37 \times 10^7$ Unités Formant Plages (UFP)/ml ; souche ts, $1,05 \times 10^8$ UFP/ml) est additionné aux 99 ml restant de PBS contenant l'ozone. La suspension virale ainsi diluée 100 fois est maintenue sous agitation.

Des prélèvements de 0,5 ml sont effectués à divers temps après l'addition de la suspension virale (tableaux 1 et 2). Des dilu-

tions sont réalisées à partir de chaque prélèvement.

Les cellules GBK sont infectées par les différentes dilutions à raison de 0,1 ml par puits. Après une heure d'adsorption à 37 °C dans un incubateur à atmosphère contrôlée (100 % d'humidité relative, 5 % de CO₂), les cellules sont recouvertes de MEM contenant 1 % d'agarose. Après 5 jours, elles sont fixées au formol 10 %, puis colorées au cristal violet.

Essai de restriction de la multiplication du BHV 1 par l'ozone

Des dilutions de raison 10 de la souche LA sont inoculées à des cellules GBK. Après une heure d'adsorption, les tapis cellulaires sont recouverts de MEM contenant 1 % d'agarose et placés dans un caisson étanche à l'intérieur duquel la température est maintenue à 37 °C, sous une atmosphère saturée d'humidité et soumis en permanence à un flux d'air sec contenant 5 % de CO₂ et 1 à 1,4 ppm d'ozone.

Des cellules infectées, placées à 37 °C dans un incubateur à atmosphère contrôlée, servent de témoin.

Après 4 jours, les cellules sont fixées au formol 10 % et colorées au cristal violet.

La même procédure est suivie pour d'autres tapis cellulaires ; ceux-ci, après une heure d'adsorption virale, sont recouverts de MEM dépourvu d'agarose.

RESULTATS

Essai d'inactivation du BHV 1 par l'ozone

Les tableaux 1 et 2 reprennent les résultats obtenus pour les souches LA et ts. L'inactivation est d'autant plus rapide que la concentration en ozone est élevée. La souche ts est plus vite inactivée que la souche LA.

La figure 1 représente l'inactivation virale en fonction du temps : la décrois-

TABLEAU 1. — Inactivation du BHV 1, souche Los Angeles.

U.F.P. : unités formant plages.

Concentration en ozone (mg/l)	0,25		1,05		1,60	
	U.F.P. par ml	% d'activité virale	U.F.P. par ml	% d'activité virale	U.F.P. par ml	% d'activité virale
Titre viral :	$2,2 \times 10^7$	100	$2,32 \times 10^7$	100	$2,32 \times 10^7$	100
Après 15 s	$2,09 \times 10^6$	9,55	$6,7 \times 10^5$	2,9	$3,6 \times 10^5$	1,55
1 min	$4,8 \times 10^5$	2,2	$1,3 \times 10^5$	0,57	4×10^4	0,17
2 min	$1,8 \times 10^5$	0,83	3×10^4	0,13	$1,5 \times 10^4$	0,064
3 min	$6,5 \times 10^4$	0,3	10^4	0,043	0	0
4 min	10^4	0,045	0	0	0	0
5 min	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 2. — Inactivation du BHV 1, souche thermosensible.

Concentration en ozone (mg/l)	initiale : 0,55 résiduelle : 0,4		initiale : 1 résiduelle : 0,75	
	U.F.P. par ml	% d'activité virale	U.F.P. par ml	% d'activité virale
Titre viral :	$1,05 \times 10^8$	100	$1,05 \times 10^8$	100
Après 15 s	$7,73 \times 10^6$	7,3	$4,9 \times 10^5$	0,46
45 s	$9,4 \times 10^5$	0,90	$1,25 \times 10^5$	0,12
1 min 15	$6,05 \times 10^5$	0,58	$6,67 \times 10^4$	0,063
1 min 45	$3,08 \times 10^5$	0,29	4×10^4	0,038
2 min 15	$1,47 \times 10^5$	0,14	2×10^4	0,019
2 min 45	$7,5 \times 10^4$	0,07	0	0
3 min 15	4×10^4	0,04	0	0
3 min 45	3×10^4	0,03	0	0
4 min 15	10^4	0,009	0	0

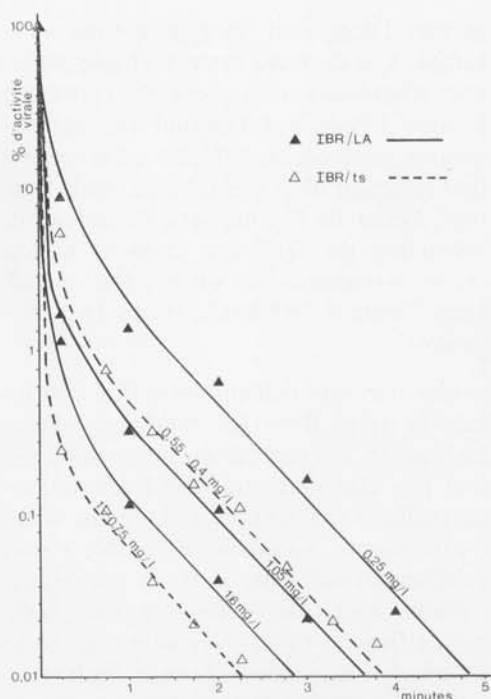


Fig. 1. — Inactivation du BHV 1 [souches Los Angeles (LA) et thermosensible (ts)] par l'ozone en fonction du temps.

sance du titre viral est très intense durant la première minute de contact avec l'ozone (fig. 2).

Essai de restriction de la multiplication du BHV 1 par l'ozone

Aucune réduction du nombre de plaques n'a été observée dans les tapis cellulaires infectés, recouverts d'agarose et soumis à l'action continue d'une atmosphère ozonée (1 à 1,4 ppm). Un certain effet cytotoxique s'est toutefois manifesté.

Une nette restriction de l'effet cytopathogène (ECP) est apparue dans les cultures de GBK maintenues dans le milieu liquide et soumise à la même atmosphère ozonée : après 4 jours, l'ECP était total dans les cultures cellulaires témoins pour les dilutions virales 10^{-2} et 10^{-3} , alors que, sous atmosphère ozonée, aux mêmes dilutions, l'ECP était incom-

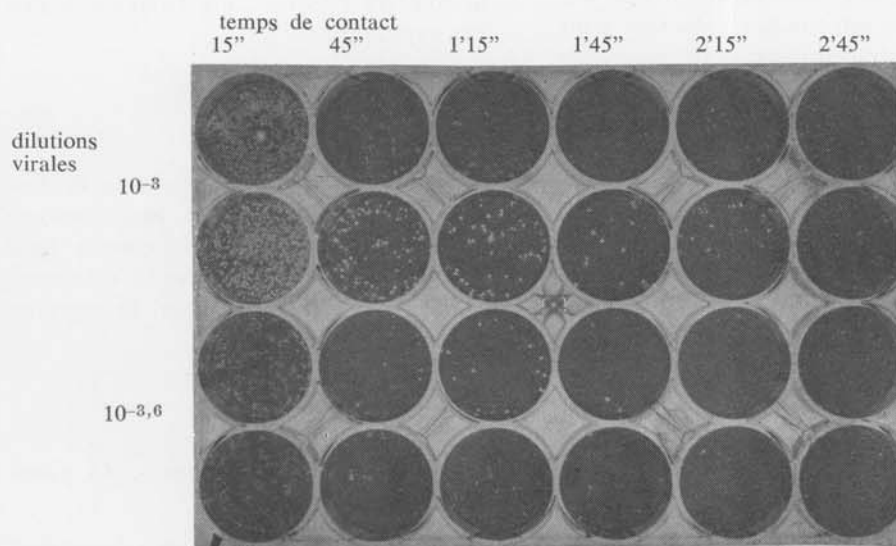


Fig. 2. — Inactivation du BHV 1 (souche ts) par l'ozone : réduction du nombre de plaques. Concentration en ozone : initiale : 0,55 mg/l ; résiduelle : 0,4 mg/l ; Titre de la suspension virale : $1,05 \times 10^8$ U.F.P./ml.

plet et se présentait sous la forme de plages de lyse.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le BHV 1 est rapidement inactivé par l'ozone ; cette inactivation est complète après un temps déterminé, qui varie selon la concentration en ozone (tableaux 1 et 2). De même, la vitesse d'inactivation augmente avec la concentration en ozone (fig. 1). La souche vaccinale ts est sensible à l'ozone et est plus rapidement inactivée que la souche LA (fig. 1). L'inactivation du BHV 1 est du même ordre que celles obtenues pour d'autres virus (Block, 1980 ; Coin et al., 1964 ; Foster et al., 1980 ; Roy et al., 1980 ; Walsh et al., 1980).

Après la phase d'adsorption, le BHV 1 n'est pas inactivé par l'ozone. Par contre, l'extension de l'ECP est limitée en milieu liquide ; il est probable que le milieu se soit chargé en ozone aux dépens de l'atmosphère, à une concentration telle que les particules infectieuses présentes dans le milieu extracellulaire sont inactivées en grande partie ; cependant, les particules intracellulaires échappent à cette inactivation. Comme le BHV 1 peut se propager de cellule à cellule à la faveur de ponts intercellulaires (Stevens et Groman, 1964 ; Pastoret et al., 1982), il conserve la faculté d'infecter les cellules voisines et de former des plages de lyse. Cette situation est analogue à celle qui

permet l'obtention de plages sous anti-sérum. Ces données apportent une ébauche d'explication concernant l'effet de l'ozone inhalé par l'animal sur la muqueuse respiratoire infectée : l'extension de l'infection n'est pas inhibée, mais freinée ; l'effet de l'ozone sera davantage la restriction de l'émission dans le milieu (virus extracellulaire) qu'un effet curatif pour l'animal (inhibition de la multiplication).

Ces résultats demandent à être confirmés *in vivo*, dans les conditions d'une étable : la concentration inactivante ne doit pas être irritante pour les muqueuses oculaire et respiratoire. De plus, comme la souche vaccinale ts semble particulièrement sensible, il serait nécessaire d'étudier l'effet de l'ozonation des locaux sur l'efficacité de la vaccination à l'aide de souches atténuées. Il serait également utile de connaître l'action de l'ozone sur d'autres agents pathogènes pour le bétail : ces renseignements permettraient alors d'évaluer de manière plus complète le rôle de l'ozone dans l'assainissement des exploitations.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur A. Dewaele, service de Pathologie générale, pour les renseignements qu'il nous a fournis et le Docteur G. d'Ieteren, service de Chirurgie, pour le matériel qu'il nous a prêté.

REFERENCES

- BLOCK J.C. Elimination des bactéries et des virus par ozonation. in « L'ozonation des eaux, manuel pratique » édité par W.J. Maaschelein, 1980, p. 53, *Technique et documentation*, Paris.
- COIN L., HANNOUN C., GOMELLA C. Inactivation par l'ozone du virus de la polio-

myélite présent dans les eaux. *La Presse Médicale*, 1964, **72**, 2153.

- ERB F. Toxicité de l'ozone. in « L'ozonation des eaux, manuel pratique » édité par W.J. Maaschelein, 1980, p. 151, *Technique et documentation*, Paris.

- FOSTER D.M., EMERSON M.A., BUCK C.E., WALSH D.S., SPROUL O.J. Ozone inactivation of cell- and fecal-associated viruses and bacteria. *J.W.P.C.F.*, 1980, **52**, 2174.
- PASTORET P.-P. Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*). Aspects biologiques et moléculaires. *Thèse*, 1979, Université de Liège.
- PASTORET P.-P., THIRY E., BROCHIER B., DERBOVEN G. *Bovid herpesvirus 1* infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann. Rech. Vét.*, 1982, sous presse.
- PRIEM R. Recherches d'orientation concernant la lutte, au moyen d'ozone, contre les émanations des porcheries d'engraissement, et influence de l'ozone sur les performances des animaux. *Revue de l'Agriculture*, 1974, **27**, 1265.
- ROY D., ENGELBRECHT R.S., WONG P.M.Y., CHIAN E.S.K. Inactivation of enteroviruses by ozone. *Progr. Wat. Tech.*, 1980, **12**, 819.
- SEVERIN M. Etude de l'ozoniseur « Litha ». *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 1972, **7**, 260.
- SHROYER E.L., EASTERDAY B.C. Studies on the pathogenesis of infectious bovine rhinotracheitis following aerosol exposure. *Cornell Vet.*, 1968, **58**, 442.
- STEVENS J.G., GROMAN N.B. Infectious bovine rhinotracheitis replication, cytopathology, and plaque formation in the presence and absence of nucleic acid analogues. *J. Bacteriol.*, 1964, **87**, 446.
- THIRY E., PASTORET P.-P., DESSY-DOIZE 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'azoospermie. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, 207.
- WALSH D.S., BUCK C.E., SPROUL O.J. Ozone inactivation of floc associated viruses and bacteria. *Journal of the environmental engineering division*, 1980, **106**, 711.
- ZYGRAICH N., LOBMANN M., VASCOBOINIC 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

Ozone effect on infectious bovine rhinotracheitis virus (*Bovid herpesvirus 1*)

The effect of ozone on *Bovid herpesvirus 1* (BHV 1) was studied using two strains: the Los Angeles (L A) strain and a vaccine thermosensitive (ts) strain. Ozone was produced by a « Litha » ozonizer.

Ozone quickly inactivates BHV 1 in PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.2). The inactivation of the ts strain is more pronounced and the increase of ozone concentrations (0.25 to 1.6 mg/l) accelerates the inactivation.

No plaque reduction is observed in BHV 1 infected GBK cells (Georgia Bovine Kidney) under agarose overlay maintained after viral adsorption in an ozonized atmosphere (dry air containing 1 to 1.4 ppm ozone and 5 % CO₂). Nevertheless, the cytopathic effect is restricted under liquid overlay probably due to the inactivation of extracellular infectious particles.

The meaning of these results for the « *in vivo* » situation is discussed.