

ARTICLE ORIGINAL

Infection expérimentale de veaux par des souches du virus de la diarrhée virale bovine isolées de syndromes hémorragiques

HAMERS, C. *, COUVREUR, B. **, DEHAN P. *, LETELLIER, C. **, LEWALLE, P. ***,
KERKHOFS, P. ** et PASTORET, P.-P. *

* Service d'Immunologie et de Vaccinologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20 – 4000 Liège

** Service de Virologie Bovine, Centre d'Etudes et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CERVA), Groeselenberg 99, – 1180 – Uccle

*** Laboratoire d'Hématologie Expérimentale, Institut J. Bordet, 121 Boulevard de Waterloo, – 1000 – Bruxelles

RESUME. Des syndromes hémorragiques associés à une infection aiguë par le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) sont décrits de plus en plus souvent en Europe et en Amérique du Nord. La reproduction expérimentale de syndromes hémorragiques a déjà été réalisée avec des souches d'origine américaine. Le but de cette étude était de tester des souches de BVDV isolées à partir de cas sporadiques de syndrome hémorragique survenus en France et en Belgique. Six souches virales ont été multipliées en culture de cellules puis inoculées à des veaux indemnes de BVDV. Des tests d'isolement viral, l'analyse des paramètres sanguins et l'examen clinique des animaux ont été réalisés tous les deux jours jusqu'au 25^e jours après inoculation. Tous les veaux inoculés ont séroconverti sans cependant présenter de signes cliniques particuliers.

Ce résultat pourrait indiquer une virulence moindre des souches testées, par rapport aux souches hémorragiques de BVDV isolées en Amérique du Nord.

INTRODUCTION

Jusqu'en 1985, le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) était classiquement associé à deux entités cliniques distinctes : la diarrhée virale bovine (BVD) et la maladie des muqueuses (MD), décrites respectivement en 1946 (Olafson et al.) et en 1953 (Ramsey et Chivers). En 1989, Corapi et al. identifient, aux Etats-Unis, une nouvelle entité clinique provoquée par ce virus, caractérisée par une thrombocytopénie sévère associée à un syndrome hémorragique. Peu de temps après, Pellerin et al. (1994) décrivent au Canada de sévères épidémies associées au BVDV, caractérisées elles aussi par un taux de mortalité qui atteint 30 à 50 %, y

compris chez les bovins adultes. Ces infections par des souches thrombocytopéniques peuvent conduire à des pertes économiques très importantes ; ainsi, au Québec, l'apparition de ces nouvelles souches a coïncidé avec une multiplication par 4 des mortalités enregistrées chez les veaux. Les signes cliniques présentés par les animaux sont similaires à ceux observés après infection par le virus de la peste porcine classique (Classical Swine Fever Virus, CSFV) chez le porc, et comprennent notamment fièvre, anorexie, leucopénie marquée, thrombocytopénie sévère, anémie et de nombreuses hémorragies disséminées. Ces syndromes hémorragiques semblent d'ailleurs liés à des souches très par-

ticulières de BVDV, plus proches par certaines de leurs caractéristiques génomiques et antigéniques des souches de CSFV ou du virus de la maladie de Border (BDV) que des souches classiques de BVDV (Ridpath et al., 1994 ; Tijssen *et al.*, 1996). Sur base de leurs caractéristiques génotypiques, ces nouvelles souches de BVDV dites de type II sont aujourd'hui classées, au sein du genre pestivirus, séparément des souches de BDV, de CSFV et des souches BVDV classiques de type I. Le typage rétrospectif de souches de BVDV conservées dans les collections de divers laboratoires montre que des souches de type II circulent depuis longtemps y compris en Europe et que toutes les souches de

type II ne sont pas associées à une hypervirulence.

La reproduction expérimentale de la maladie fut notamment réalisée aux Etats-Unis par inoculation de leucocytes sanguins isolés d'un animal en phase clinique (Corapi et al., 1989) ou après passage du virus en culture de cellules (Bolin et Ridpath, 1995). Cette reproduction semble cependant difficile même chez de jeunes animaux.

Les premiers cas de syndrome hémorragique associés au BVDV apparaissent en Europe au début des années 1990, notamment en Belgique (Broes et al., 1992) puis en France (Lecomte et al., 1996) et de nouveaux cas sont régulièrement identifiés depuis. Contrairement aux cas décrits en Amérique du Nord, il s'agit le plus souvent de cas sporadiques qui ne semblent pas systématiquement associés à des souches de type II.

Une tentative de reproduction expérimentale du syndrome thrombocytopénique lié au virus BVDV, à partir de souches de BVDV, isolées en France et en Belgique, d'animaux présentant une maladie hémorragique, est décrite dans cet article.

MATERIEL ET METHODES

Souches virales

Culi 1 et Culi 3 : ces deux souches de BVDV ont été isolées de deux cas distincts de syndrome hémorragique (Lecomte et al. 1996).

Culi 4 : a été isolée à partir du cadavre d'un veau blanc-bleu belge de 6 semaines, mort 3 jours après l'apparition de troubles respiratoires. L'examen nécropsique mettait en

évidence de nombreuses pétéchies disséminées au niveau du cœur, de la muqueuse de la caillette, de la séreuse des rumen, réseau et feuillet, sur la muqueuse intestinale et sur les reins. Une hémorragie cérébro-spinale avait également été observée.

Culi 6 : l'isolement de cette souche fut réalisé suite à l'autopsie d'un veau mâle blanc-bleu-belge de 3 mois, mort quelques heures après l'apparition de troubles respiratoires. A l'autopsie, le cadavre présentait de nombreuses pétéchies disséminées au niveau des muscles, de la caillette, de l'intestin, de la vessie, de la plèvre, du péritoine et du thymus.

Marloie 01 : a été isolée suite à l'autopsie d'un veau de 6 mois, mort subitement après avoir présenté du méléna. L'examen nécropsique permit de mettre en évidence des lésions hémorragiques du réseau, de l'ensemble de l'intestin et de la rate.

L 256 : est une souche d'origine française, isolée à partir de leucocytes d'une génisse de 26 mois présentant une thrombocytopénie et une anémie sévères, associées à des hémorragies gingivales, vulvaires, conjonctivales et de l'épistaxis. Six cas similaires avaient été observés 3 ans auparavant dans les environs immédiats de l'exploitation.

Dans tous les cas, la recherche d'autres agents pathogènes, notamment de *Salmonella* sp., fut négative.

La recherche de biotype cytopathogène du BVDV, dans le but d'exclure du diagnostic une forme atypique de maladie des muqueuses, réalisée pour les souches Culi par mise en culture sur cellules testiculaires bovines s'est révélée négative. Lors de leur mise en culture, les souches Marloie 01 et L256 n'ont pas non

plus présenté d'effet cytopathogène. Ces souches sont donc de biotype non-cytopathogène.

Un génotypage des souches testées a été réalisé selon la méthode décrite par Letellier et al. (1999), par RT-PCR et amplification de fragments spécifiques. Cette technique montre que toutes les souches testées appartiennent au génotype I.

Protocole expérimental

Première série : Dans un premier temps, une série d'inoculations fut réalisée sur trois veaux de race pie-noire, âgés de 6 à 8 semaines, négatifs pour un test d'antigénémie BVDV et présentant un titre en anticorps neutralisant de la souche NADL, mesuré selon la méthode décrite par Rossi et Kiesel (1971), inférieur à 1/40. Les souches Culi 1, Culi 3 et Marloie 1 furent inoculées après 4 passages en culture de cellules, selon la schéma présenté dans le tableau 1. Le suivi journalier des animaux jusqu'au jour 25 comprenait l'observation, le prélèvement d'écouvillons nasaux et de sang pour détermination de la formule sanguine, la numération des thrombocytes et la mise en évidence de virus.

Seconde série : Lors d'une seconde série d'inoculations, 8 veaux de race Holstein danoise, âgés de 6 à 8 semaines, négatifs au test d'antigénémie et dépourvus d'anticorps furent inoculés par groupes de 2 avec les souches Culi 4, Culi 6 et L256 selon le schéma présenté dans le tableau 1. Les animaux furent observés tous les jours, alors que les prélèvements étaient réalisés un jour sur deux. Les paramètres étudiés étaient identiques à ceux de la première série d'inoculations. En fin d'expérience,

Tableau 1

Schéma d'inoculation utilisé lors de l'infection expérimentale de veaux par des souches de BVDV isolées de cas de syndrome hémorragique indiquant notamment la dose et la voie d'inoculation (I.N. = intra-nasal, I.V. = intraveineux).

Veau N°	âge au j0	titre SN anti BVDV	Souche	passage	Dose et voie d'inoculation
1	52j	1/8	Culi 1	4	10 ⁶ TCID ₅₀ I.N. + 10 ⁶ TCID ₅₀ I.V.
2	54j	1/16 > titre > 1/40	Culi 3	4	10 ⁶ TCID ₅₀ I.N. + 10 ⁶ TCID ₅₀ I.V.
3	48j	0	Marloie 01	4	10 ⁶ TCID ₅₀ I.N. + 10 ⁶ TCID ₅₀ I.V.
4 et 5	44j et 52j	0	L256	2	7,6x10 ⁶ TCID ₅₀ I.N. + 3,6x10 ⁶ TCID ₅₀ I.V.
6 et 7	49j et 44j	0	Culi 6	0	5,7x10 ⁶ TCID ₅₀ I.V.
8 et 9	39j et 47j	0	Culi 4	1	1,7x10 ⁶ TCID ₅₀ I.N.
10 et 11	47j et 41j	0	Culi 6	1	9,5x10 ⁶ TCID ₅₀ I.N.
12	51j	0	contrôle	—	—

le veau utilisé comme contrôle a été inoculé avec la souche Culi 3, selon la procédure décrite pour l'animal 2 (tableau 1).

Détection des antigènes viraux

La détection des antigènes viraux sur leucocytes sanguins fut réalisée par le test de détection de l'antigène p80 (Serelisa BVD-MD AG mono indirect, Synbiotics), puis par immunofluorescence indirecte (IFI), selon la méthode décrite par Boulanger et al. (1991), après isolement viral et amplification en culture de cellules. La détection dans les écouvillons nasaux fut réalisée par isolement viral en culture de cellules et IFI.

Détection des anticorps anti-BVDV

La présence d'anticorps anti-BVDV dans le sérum des animaux fut testée par la technique de séroneutralisation vis-à-vis de la souche NADL. Les sérums des jours 0 et 25 furent testés afin de mettre en évidence une séroconversion éventuelle.

Formule sanguine

Les paramètres hématologiques suivants ont été mesurés : numération et formule leucocytaires, numération des hématies, hématocrite et dosage de l'hémoglobine, numération des thrombocytes sanguins. Les numérations de cellules ont été effectuées sur Coulter Counter ZM, la formule leucocytaire a été effectuée par examen microscopique et la numération plaquettaire a été réalisée sur appareil Technicon.

RESULTATS

Lors des deux séries, les animaux ont présenté une légère diarrhée transitoire dans les jours qui ont suivi l'inoculation. Seul l'animal 2 a présenté des troubles respiratoires aboutissant à sa mort, au jour 11. L'autopsie a révélé des lésions de pneumonie sévère avec présence de *Pasteurella* sp.

Tous les animaux ont conservé des paramètres sanguins dans les limites de la normalité, excepté l'animal 2 qui présentait une leucocytose importante, du jour 0 jusqu'à sa mort. Cette analyse montre que l'animal 2 était déjà malade avant l'inoculation.

La détection des antigènes viraux tant sur les écouvillons nasaux que sur les prélèvements sanguins sont restés négatifs durant toute la durée des manipulations. Tous les animaux inoculés ont cependant séro-converti, comme le montrent les résultats des tests de séro-neutralisation présentés dans le tableau 2.

sentant des lésions caractéristiques de syndrome hémorragique. L'inoculation de ces souches à des veaux sains n'a, dans aucun des cas, permis de reproduire le syndrome.

Les souches utilisées dans notre expérience diffèrent des souches nord américaines impliquées dans les syn-

Tableau II Séroconversion, mesurée par la méthode de séro-neutralisation envers la souche NADL du virus BVD, chez des veaux infectés expérimentalement par des souches isolées de cas de syndrome hémorragique.				
Veau N°	souche	dose totale	Titre en anticorps neutralisant le BVDV (inverse de la dilution)	
			jour 0	jour 25
1	Culi 1	2×10^7	8	40
2	Culi 3	2×10^7	<40	Mort (J11)
3	Marloie 01	2×10^7	0	20
4	L 256	$4,4 \times 10^7$	0	128
5	L 256	$4,4 \times 10^7$	0	>256
6	Culi 6	$5,7 \times 10^5$	0	16
7	Culi 6	$5,7 \times 10^5$	0	64
8	Culi 4	$1,7 \times 10^6$	0	32
9	Culi 4	$1,7 \times 10^6$	0	128
10	Culi 6	$9,2 \times 10^5$	0	32
11	Culi 6	$9,2 \times 10^5$	0	16
12	contrôle	—	0	0

En fin d'expérience, la souche Culi 3 a été inoculée à l'animal témoin de la deuxième série, selon la même procédure que pour l'animal 2. L'animal n'a pas présenté de signes cliniques particuliers ni de variations pathologiques de ses paramètres sanguins.

DISCUSSION

La transmission expérimentale de syndromes hémorragiques associés à des souches thrombocytopeniques de BVDV a été réalisée par plusieurs équipes nord américaines, soit par injection de leucocytes sanguins isolés d'animaux en phase aiguë de la maladie (Corapi et al., 1989) soit au départ de virus isolé et multiplié en culture de cellules (Bolin et Ridpath, 1995). Tous les auteurs insistent sur la difficulté à reproduire expérimentalement la maladie, même sur de jeunes animaux. Une maladie thrombocytopenique, aboutissant éventuellement à la mort de l'animal était observée dans 50 à 80 % des cas.

Dans nos expériences, toutes les souches testées avaient été isolées récemment à partir d'animaux pré-

dromes hémorragiques avérés par 2 caractéristiques importantes. D'une part l'analyse de leur région 5' non codantes montre que nos souches appartiennent toutes au génotype BVDV I, comme les souches classiques du virus. D'autre part ils ont toujours été isolés à partir de cas sporadiques de syndrome hémorragique, alors que les cas nord américains l'ont été à l'occasion d'importantes épidémies.

Il est donc possible que nos souches n'aient pas les mêmes caractéristiques de virulence que les souches américaines testées par Corapi et al. (1989) ou Bolin et Ridpath (1994). Peut-être même ont-elles été isolées fortuitement d'animaux atteints d'un purpura hémorragique, lié à une autre condition. L'hypothèse de cas de maladies des muqueuses atypiques n'a, quant à elle, pas été retenue : la présence d'une souche cytopathogène n'ayant jamais été démontrée.

Bien que la littérature ne le décrive pas, il n'est pas impossible que des animaux infectés persistants et immunotolérants à l'égard du BVDV

présentent une sensibilité particulière à des agents nosogènes induisant des pathologies de type purpura. Cette hypothèse expliquerait l'isolement du virus chez des animaux atteints de syndrome hémorragique et l'impossibilité de reproduire la maladie par inoculation du virus à des animaux sains. Elle expliquerait également pourquoi la maladie revêt en France et en Belgique une allure essentiellement sporadique.

Quelle que soit la raison de cette difficulté à reproduire la maladie, il n'en demeure pas moins que des pertes économiques considérables y sont associées, notamment en Amérique du Nord et qu'il est indispensable de s'en prémunir. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches sur les cas de syndrome hémorragique associés au BVDV et de viser au développement éventuel de vaccins conférant une immunité protectrice contre les souches impliquées.

REMERCIEMENTS

Ces recherches ont été réalisées grâce au financement du Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture. Nous tenons à remercier les Drs D. Cassart et D. Desmecht (Service de Pathologie Générale, Professeur F. Coignoul, Université de Liège) pour la sélection

des cas cliniques pertinents en salle d'autopsie (Culi 4 et Culi 6), Mr A. Collard (Centre d'Economie Rurale, Marloie) pour la mise à disposition d'une souche de BVDV, Mr G. Vandendaele (CERVA) pour sa collaboration à la réalisation des examens hématologiques, Mme M. Loncar (Université de Liège) pour les isolements viraux et le Dr V. Bitsch (Cattle Health Laboratory, Danish Dairy Board) pour son aide précieuse dans l'obtention de veaux indemnes de BVDV.

SUMMARY

Experimental infection of calves with bovine viral diarrhea virus strains isolated from haemorrhagic syndromes

Acute bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection associated with thrombocytopenia and hemorrhages is observed with increased frequency in Europe and North America. Experimental reproduction of hemorrhagic syndromes has been previously performed by others with American strains. The purpose of this study was to test BVDV strains isolated from sporadic cases of hemorrhagic syndrome, in Belgium and France. Six viral isolates were grown on cell cultures and culture

supernatants were inoculated to young BVDV-free calves. Viral isolation tests, blood parameters analysis and clinical signs recording were performed every other day, for 25 days after inoculation.

For all BVDV strains, calves seroconverted but clinical signs of disease were almost absent. This unexpected result could indicate a lower virulence of strains tested in this study as compared to American hemorrhagic strains of BVDV.

BIBLIOGRAPHIE

- BOLIN S.R., RIDPATH J.F. Assessment of protection from systemic infection of disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 755-759.
- 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.
- BROES A., WELLEMANS G., DHEEDENE J. Syndrome hémorragique chez des bovins infectés par le virus de la diarrhée virale bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1992, **137**, 33-38.
- CORAPI W.V., FRENCH T.W., DUBOVI E.J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.*, 1989, **63**, 3934-3945.
- LECOMTE C., NAVETAT H., HAMERS C., LAMBOT M., SCHELCHER F., CABANIE P., PASTORET P.-P. Isolement du virus de la diarrhée virale bovine de deux cas de syndromes hémorragiques, chez des bovins de race charolaise. *Ann. Méd. Vét.*, 1996, **140**, 435-438.
- LETELLIER C., KERKHOFS P., WELLEMANS G., VANOPDENBOSCH E. Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcriptase-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet. Microb.*, 1999, **64**, 155-167.
- OLAFSON P., MC CALLUM A.D., FOX F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, 1946, **36**, 205-213.
- PELLERIN C., VAN DEN HURK J., LECOMTE J., TUSSEN P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 1994 Sep., 1994, **203**, 260-268.
- RAMSEY F.K., CHIVERS W.H. Mucosal Disease of cattle. *North Amer. Vet.*, 1953, **34**, 629-633.
- RIDPATH J.F., BOLIN S.R., DUBOVI, E.J. Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into genotypes. *Virology*, 1994, **205**, 66-74.
- ROSSI C.R., KIESEL G.K. Microtiter tests for detecting antibody in bovine serum to parainfluenza 3 virus, infectious bovine rhinotracheitis virus, and bovine virus diarrhea virus. *Appl Microbiol.*, 1971, **22**, 32-36.
- TIJSSSEN P., PELLERIN C., LECOMTE J., VAN DEN HURK J. Immunodominant E2 (gp 53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virology*, 1996, **217**, 356-361.