

Isolement du virus de la diarrhée virale bovine de deux cas de syndromes hémorragiques, chez des bovins de race charolaise

LECOMTE, C.¹, NAVETAT, H.², HAMERS, C.¹, LAMBOT, M.¹, SCHELCHER, F.³, CABANIE, P.³, ET PASTORET, P.-P.¹

¹ Service d'Immunologie-Vaccinologie,

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège B43bis, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

² 6, rue du Général de Gaulle, 03130 Le Donjon, France.

³ Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France.

RESUME. Un syndrome hémorragique associé à l'infection par des souches non-cytopathogènes du virus de la diarrhée virale bovine (BVDV/MD) a été décrit d'abord aux Etats-Unis et au Canada, puis, plus récemment, dans plusieurs exploitations du sud de la Belgique. Deux cas d'un syndrome similaire ont été identifiés en France, et le virus BVD, de biotype non-cytopathogène, a été isolé à partir du sang et des organes des animaux malades.

1. INTRODUCTION

Le virus de la diarrhée virale bovine ou BVDV/MD (Bovine Viral Diarrhea Virus /Mucosal Disease) est un virus enveloppé faisant partie du genre Pestivirus avec deux virus apparentés, le virus de la peste porcine classique (Classical Swine Fever Virus ou CSFV) et celui de la maladie de Border du mouton (Border Disease Virus). Le virus BVD/MD est responsable d'une infection très répandue chez les bovins, dont le contrôle est rendu complexe d'une part, par l'existence de réservoirs permettant au virus de se maintenir dans les troupeaux, et d'autre part, par la grande diversité des souches virales isolées dans des troupeaux distincts.

Le principal réservoir du virus BVD/MD est constitué par les animaux infectés permanents immunotolérants (IPI), qui représentent environ 1% du cheptel bovin (Duffel & Harkness, 1985; Howard *et al.*, 1986). L'origine de ces animaux IPI est liée à la capacité du virus

BVD/MD à traverser la barrière placentaire et à infecter le fœtus *in utero*, si le virus d'infection est de biotype non cytopathogène. En effet, le BVDV/MD se présente sous deux formes biologiques ou biotypes, cytopathogène (c) ou non-cytopathogène (nc), suivant qu'il provoque ou non des lésions en culture cellulaire. Le biotype BVDc n'est pas considéré comme pathogène pour le fœtus. L'infection *in utero* par le BVDnc, très tôt durant la gestation, aboutit quant à lui à l'établissement d'une infection persistante chez le veau, qui naît IPI et le reste toute sa vie, constituant ainsi un réservoir naturel de virus pour le troupeau.

Dans le cas d'infection post-natale de bovins immunocompétents, la plupart des souches du virus BVD/MD conduisent à une maladie bénigne ou inapparente. Toutefois, des isolats d'une plus grande virulence ont été rapportés récemment aux Etats-Unis et au Canada, au sein d'épidémies sévères de BVD accompagnées de thrombocytopenie asso-

ciée à un syndrome hémorragique, et conduisant à des mortalités élevées même chez les animaux adultes (Corapi *et al.*, 1989, 1990; Rebhun *et al.*, 1989; Bolin et Ridpath, 1992). Les souches virales isolées du sang ou des organes des animaux malades appartenaient toutes au biotype non-cytopathogène. Sur base de la séquence nucléotidique de la région 5' non codante du génome viral et de celle de la région codant pour une protéine non structurale (p125), ces isolats ont été proposés comme faisant partie d'un deuxième génotype ou génotype par rapport aux souches BVDV/MD «classiques» (BVDV type II; Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Ridpath et Bolin, 1995). L'analyse antigénique réalisée à l'aide de batteries d'anticorps monoclonaux va dans le même sens, les deux méthodes montrant en outre que ces souches sont plus éloignées des souches BVDV/MD classiques qu'elles ne le sont de certains isolats viraux d'origine ovine ou porcine (Paton, 1995; Becher *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1995).

L'infection par ces souches virales thrombocytopéniques peut conduire à des pertes économiques très importantes; ainsi, au Québec, le taux de mortalité répertorié durant l'année 1993 a augmenté d'un facteur 4 avec l'apparition de ces souches (Pellerin *et al.*, 1994). Moins répandues actuellement en Europe, elles semblent toutefois faire leur apparition. Un syndrome hémorragique semblable a été identifié durant l'année 1992 dans plusieurs exploitations du sud de la Belgique (Broes *et al.*, 1992). Nous présentons dans cette étude deux cas identifiés en France, pour lesquels une thrombocytopénie sévère et un syndrome hémorragique ont pu être associés au virus BVD/MD.

2. MATERIEL ET METHODES

L'examen clinique a été complété par une analyse nécropsique et des examens complémentaires d'hématologie, histologie et virologie.

Examen hématologique : des prélèvements sanguins ont été effectués juste avant de sacrifier les deux animaux malades, pour procéder à une numération globulaire et à la détermination de la formule leucocytaire et du nombre de plaquettes.

Examen histologique : après autopsie, différents prélèvements ont été effectués pour examen histologique dans des conditions classiques, c'est-à-dire fixation au formol 10% et coloration à l'hémalum-éosine.

Examen virologique : la présence de virus BVD a été déterminée par immunofluorescence indirecte sur des coupes congelées de rate, caillette, foie et intestin, révélées à l'aide d'un antisérum de lapin dirigé contre le virus d'intérêt.

D'autre part, les prélèvements sanguins ont été adsorbés sur un tapis de cellules permissives pour le virus BVD (CTC : *calf testicular cells*), et après deux passages sur cellules, la présence de virus a été détectée par immunofluorescence indirecte sur le tapis cellulaire fixé à l'acétone (95% v/v). L'anticorps révélateur utilisé était constitué d'un mélange de six monoclonaux reconnaissant spécifiquement soit l'antigène non structural p80, soit l'une des deux glycopro-

téines majeures gp48 ou gp53 (Boulanger *et al.*, 1991).

3. RESULTATS

3.1. Examen clinique

Veau n° 1 : veau charolais femelle âgé d'un mois provenant d'un cheptel allaitant de 100 vaches. Les premiers signes cliniques sont apparus vers l'âge de trois semaines et se sont manifestés par de l'hyperthermie (supérieure à 41°C) et l'émission en petite quantité de fèces hémorragiques. Malgré un traitement symptomatique, l'hyperthermie est restée très élevée durant les deux jours suivants, s'accompagnant d'une polypnée mais sans apparition de signes anor-

maux à l'auscultation. Les signes digestifs sont restés discrets et l'animal n'était pas déshydraté. Il présentait par contre de l'hématurie. L'examen des muqueuses oculaire, gingivale et vulvaire, révèle une anémie sévère et la présence d'hémorragies. On note également un saignement faisant suite aux injections intramusculaires.

L'animal ne s'alimentant plus, il fut sacrifié après prélèvement sanguin et les organes nécessaires aux examens complémentaires ont été prélevés.

Veau n° 2 : veau charolais femelle d'un mois présentant des signes de forte hyperthermie (41°C) et d'asthénie. Les autres signes observés sont essentiellement des hémorragies au niveau des muqueuses oculaire (photo 1), linguale (photo 2),



Photos 1 et 2

hémorragies observées au niveau des muqueuses oculaire (photo 1) et linguale (photo 2).



nasale et vulvaire. L'animal dut également être sacrifié.

3.2. Résultats nécropsiques

Dans les deux cas, des hémorragies ont été observées au niveau de la muqueuse vésicale, du cæcum, du mésentère, de l'épiploon (photo 3), de la sous-muqueuse œsophagienne et de l'épicarde (photo 4).

3.3. Hématologie

Les examens hématologiques montrent une thrombocytopenie avec un taux de plaquettes de $79000/\text{mm}^3$ pour le veau 1 (valeurs normales de 100000 à $800000/\text{mm}^3$) et de $7000/\text{mm}^3$ pour le veau 2, ainsi qu'une anémie microcytaire hypochrome dans les deux cas.

3.4. Résultats histologiques

Les examens histologiques ont été réalisés essentiellement sur le veau 2. Les observations faites au niveau des différents organes sont les suivantes :

- des lésions multifocales d'hémorragie sont retrouvées dans le parenchyme rénal et au niveau de la paroi iléale, ainsi que des suffusions sanguines dans la paroi vésicale;
- au niveau de l'intestin grêle, on observe une hémorragie focale liée à la présence d'une vésicule ayant subi une dégénérescence fibrinoïde;
- les organes lymphoïdes abdominaux (rate, ganglion mésentérique) montrent une prolifération blastique marquée;

- le colon et le foie présentent une structure histologique normale; l'analyse de la moelle osseuse faite au niveau de la 7^e côte montre en outre que l'ensemble des lignées hématopoïétiques est présent, y compris la lignée mégacaryocytaire, ce qui suggère que la thrombocytopenie observée est plutôt d'origine périphérique.

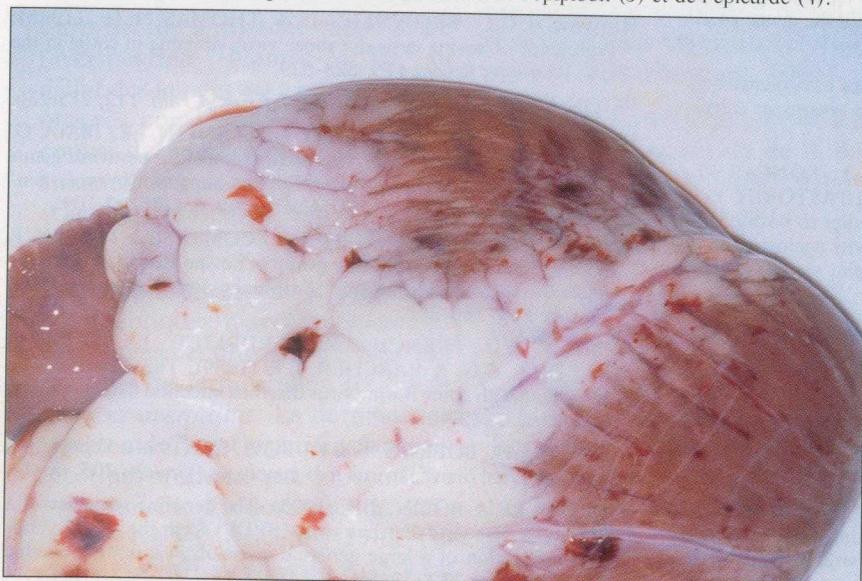
3.5. Résultats virologiques

L'immunofluorescence indirecte réalisée à l'aide d'un antisérum spécifique du virus BVD/MD s'est montrée positive sur des coupes histologiques de caillette et de rectum, et ce pour les deux cas décrits. D'autre part, le virus a pu être amplifié à partir des deux prélèvements sanguins par deux passages successifs sur un tapis de cellules bovines permissives (cellules CTC). Aucun effet cytopathogène n'a été mis en évidence. La présence du virus BVD/MD a été détectée par immunofluorescence indirecte, à l'aide du mélange d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre l'antigène non structural p80 et les deux glycoprotéines majeures (cf. Matériel et Méthodes).



Photos 3 et 4

Photos 3 et 4 : hémorragies observées au niveau de l'épiploon (3) et de l'épicarde (4).



4. CONCLUSIONS

Les deux cas que nous présentons dans cet article ont montré des signes cliniques similaires, principalement une forte hyperthermie et des lésions hémorragiques. Les examens complémentaires ont confirmé la présence d'un syndrome hémorragique et ont montré que les lésions hémorragiques s'accompagnaient d'anémie et de thrombocytopenie.

L'analyse histopathologique suggère une origine périphérique de ce syndrome hémorragique thrombocytopenique. La présence de la lignée mégacaryocytaire dans la moelle osseuse a pu être vérifiée, ce qui montre sans équivoque que la thrombocytopenie n'est pas due à un manque de production des plaquettes sanguines résultant d'une destruction des cellules souches de la moelle osseuse. En outre, certaines structures histologiques comme celles observées au niveau du colon et du foie sont tout à fait normales. Ces différentes observations sont hautement compatibles avec l'hypothèse d'une infection par

le virus BVD/MD, s'accompagnant d'une destruction périphérique massive des plaquettes consécutive à l'infection virale. Nous avons vérifié la présence du virus par immunofluorescence indirecte à l'aide d'antisérums et d'anticorps monoclonaux spécifiques. Le BVDV/MD a clairement été mis en évidence, dans un premier temps sur des coupes histologiques de caillette et de rectum, puis dans les prélèvements sanguins, après propagation sur tapis de cellules bovines permissives.

Dans les deux cas présentés, de même que dans tous les exemples décrits à ce jour où le syndrome hémorragique a pu être associé à la présence du virus BVD/MD, l'examen en culture de cellules a montré que les souches isolées à partir du sang ou des organes des animaux malades appartenaient au biotype non-cytopathogène. Le syndrome hémorragique observé ne constitue donc pas une forme particulière de maladie des muqueuses, puisque si tel était le cas, on devrait isoler une souche cytopathogène en plus de la souche de BVDV/MD non-cytopathogène. Par contre, ce syndrome atteint des animaux adultes immunocompétents, et a pu être reproduit expérimentalement lors de primo-infections (Corapi *et al.*, 1989, 1990; Bolin et Ridpath, 1992). Ces observations

suggèrent que le syndrome hémorragique thrombocytopénique associé à l'infection par le virus BVD/MD résulte d'infections post-natales par des souches non-cytopathogènes «hypervirulentes», du moins de pathogénicité plus importante que les souches BVDV/MD «classiques».

L'émergence de telles souches, d'abord aux États-Unis, plus récemment en Europe, peut avoir un impact économique considérable. En effet, la primo-infection par le virus BVD/MD n'était pas considérée comme un problème majeur, la plupart de ces infections n'entraînant que peu ou pas de signes cliniques. Par contre, contrairement à ce que l'on observe avec les souches de BVDV/MD «classiques», la primo-infection par une souche thrombocytopénique est le plus souvent létale, même chez un animal adulte immunocompétent; ces infections provoquent par conséquent de lourdes pertes lorsqu'elles touchent des troupeaux comptant un pourcentage élevé d'animaux séronégatifs. Les problèmes associés à la primo-infection par le virus BVDV/MD doivent être reconsidérés, avec la nécessité d'une stratégie de diagnostic adaptée à ces nouvelles souches «hypervirulentes», qui permettrait de les différencier des souches BVDV «classiques» et donc d'en surveiller l'émergence dans notre cheptel. La mise au point d'une

telle stratégie passera par une étape préliminaire de caractérisation génotypique et antigénique d'isolats thrombocytopéniques d'origines géographiques distinctes, ainsi que par le développement d'outils spécifiques permettant de différencier ces isolats par rapport à des souches BVDV de moindre virulence.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement les Docteurs RIZET, BIRON et VERY pour leur précieuse collaboration, ainsi que Madame LONCAR pour son assistance technique et ses précieux conseils.

SUMMARY

Isolation of bovine viral diarrhea virus from charolais calves showing hemorrhagic syndromes.

An hemorrhagic syndrome was reported in the U.S.A. and Canada in cattle infected by non cytopathic strains of the Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV/MD). It was also recently reported in several herds located in the south of Belgium. Here we describe two cases of a similar syndrome identified in France; the BVD virus was isolated from blood and organs and its biotype was also non-cytopathic.

BIBLIOGRAPHIE

- BECHER, P., KONIG, M., PATON, D.J. & THIEL, H.-J. (1995). Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology* **209**, 200-206.
- BOLIN, S.R. & RIDPATH, J.F. (1992). Differences in virulence between two non-cytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 2157-2163.
- BOULANGER, D., WAXWEILER, S., KARELLE, L., LONCAR, M., MIGNON, B., DUBUISSON, J., THIRY, E. & PASTORET, P.-P. (1991). 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.* **72**, 1195-1198.
- BROES, A., WELLEMANS, G. & DHEEDENE, J. (1992). Syndrome hémorragique chez des bovins infectés par le virus de la diarrhée virale bovine. *Ann. Méd. Vét.* **137**, 33-38.
- CORAPI, W.V., FRENCH, T.W. & DUBOVI, E.J. (1989). Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **63**, 3934-3943.
- CORAPI, W.V., ELLIOTT, R.D., FRENCH, T.W., ARTHUR, D.G., BEZEK, D.M. & DUBOVI, E.J. (1990). Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**, 590-596.
- DUFFEL, S.J. & HARKNESS, J.W. (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Veterinary Record* **117**, 240-245.
- HOWARD, C.J., BROWNLIE, J. & THOMAS, L.H. (1986). Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia in cattle in the UK. *Veterinary Record* **119**, 628-629.
- PATON, D.J. (1995). Pestivirus diversity. *J. Comp. Path.* **112**, 215-236.
- PATON, D.J., SANDS, J.J., LOWINGS, J.P., SMITH, J.E., IBATA, G. & EDWARDS, S. (1995). A proposed division of the pestivirus genus into subgroups using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization assays and genetic sequencing. *Vet. Res.* **26**, 92-109.
- PELLERIN, C., VAN DEN HURK, J., LECOMTE, J. & TIJSSSEN, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**, 260-268.
- REBHUN, W.C., FRENCH, T.W., PERDRIZET, J.A., DUBOVI, E.J., DILL, S.G. & KARCHER, L.F. (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J. Vet. Inter. Med.* **3**, 42-46.
- RIDPATH, J.H., BOLIN, S.R. & DUBOVI, E.J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* **205**, 66-74.
- RIDPATH, J.F. & BOLIN, S.R. (1995). The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) form the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a non cytopathic BVDV. *Virology* **212**, 39-46.