

Variations de l'antigénémié dans l'infection persistante des bovins par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD)

WAXWEILER S. *, MIGNON B. *, BOULANGER D. *, GREIMERS R. **, DEFRESNE M.P. **, BONIVER J. **, KARELLE BUI-THI L. *, PASTORET P.P. *

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

** Université de Liège
Service d'anatomie pathologique
CHU
Sart Tilman - 4000 Liège

Manuscrit déposé le 24/10/1991.

INTRODUCTION

Le virus de la diarrhée virale bovine (Bovine Viral Diarrhoea, ou BVD) est très répandu en Europe et en Amérique du Nord, où la proportion de sérums de bovins possédant des anticorps spécifiques de ce virus varie de 36 à 88 %, avec une moyenne de 70 % chez les animaux adultes (PASTORET *et al.*, 1986); par contre, la prévalence des animaux infectés de manière persistante représente moins de 1 % dans ces mêmes régions (PETERS *et al.*, 1987; WAXWEILER *et al.*, 1989). Ces animaux infectés de manière persistante, futurs candidats à la maladie des muqueuses à issue toujours fatale, peuvent cependant rester en bonne santé apparente pendant plusieurs années (BROWNLIE

et al., 1987; CORIA et Mc CLURKIN, 1978) et jouent un rôle essentiel dans l'épidémiologie de la maladie. En effet, ils représentent des sources permanentes de virus et peuvent contaminer le reste du cheptel avec parfois de graves conséquences;

- une vache infectée de manière persistante donnera naissance à des veaux également infectés de manière persistante;
- le virus BVD est souvent rendu responsable d'avortements et de retour en chaleurs après insémination («repeat breeding») (ARCHBALD, 1974; ARCHBALD et ZEMJANIS, 1977), par inhibition de la fécondation (GRAHN *et al.*, 1984);

RESUME

Six prélèvements sanguins ont été réalisés à quinze jours d'intervalle chez trois bovins adultes infectés expérimentalement de manière persistante par la souche Pe515 non cytopathogène du virus de la diarrhée virale bovine, de même que chez un animal non virémique, à titre de témoin. Les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux et par ELISA et les résultats ont été comparés à ceux du test d'immunofluorescence indirecte, la méthode de référence. Des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines de 48, 53 et 80 kd du virus BVD ont été employés dans ces différents tests.

Des fluctuations du taux d'infection ont ainsi pu être enregistrées entre les différents prélèvements, indiquant que des variations de l'antigénémié peuvent survenir chez les animaux infectés de manière persistante par le virus BVD.

- une transmission vénérienne du virus BVD n'est pas à exclure, puisque le virus est retrouvé dans l'urine et les reins de veaux deux semaines après une infection expérimentale. Ces virus sont éliminés lors de l'éjaculation, sont ensuite résorbés au niveau de l'endomètre (ARCHBALD et ZEMJANIS, 1977) et, par une modification de l'environnement endométrial, affecteraient la croissance embryonnaire (BIELANSKI et HARE, 1988). De même, WHITMORE *et al.*, (1981) ont démontré une diminution significative du taux de conception en cas d'inoculation intrautérine du virus BVD au moment de l'insémination.

La présence, au sein des troupeaux, d'animaux infectés de manière per-

sistante peut donc entraîner des pertes financières importantes. BENNET et DONE (1986) ont en effet estimé le coût annuel de l'infection par le virus BVD au Royaume-Uni à 47 millions de livres. Il est par conséquent essentiel de pouvoir déterminer si la multiplication du virus BVD dans l'organisme, associée à une excrétion de quantités élevées de virus, persiste sans variation pendant toute la vie de l'animal, afin de pouvoir dépister tous les animaux infectés de manière persistante par le virus BVD, sans courir le risque d'obtenir des résultats faussement négatifs.

La méthode classique de détection des animaux infectés de manière persistante consiste dans l'amplification en culture de cellules du virus éventuellement présent dans le «buffy coat» (zone de séparation entre le plasma et les érythrocytes, contenant la fraction leucocytaire sanguine) des animaux, suivie de son identification par un test d'immunofluorescence indirecte. Cette technique est la méthode légale employée en accord avec les directives de la Commission des Communautés Européennes (PASTORET *et al.*, 1989). Cependant, cette méthode étant particulièrement lourde et coûteuse, d'autres techniques ont été envisagées: un ELISA sandwich a donc été mis au point par FENTON *et al.*, (1989) et par MIGNON *et al.* (1991). Par ailleurs, la cytométrie en flux permet la détection des antigènes viraux directement au sein des cellules infectées (QVIST *et al.*, 1990, 1991); cette technique permet la caractérisation d'un très grand nombre de cellules (2 000 cellules sont analysées par seconde en moyenne), ainsi que la quantification du pourcentage de leucocytes sanguins associés au virus BVD.

Afin d'étudier d'éventuelles variations de l'antigénémié chez les animaux infectés de manière persistante par le virus BVD, des prélèvements de sang ont été réalisés à intervalle régulier chez des animaux virémiques. Le statut de ces animaux a été vérifié lors de chaque prise de sang par la méthode de détection classique. Par ailleurs, le pourcentage de leucocytes sanguins

infectés par le virus BVD a été déterminé par cytométrie en flux et le niveau d'infection des animaux a été quantifié par un ELISA sandwich. La formule leucocytaire de chacun des animaux a été établie lors de chaque prélèvement.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Trois bovins adultes âgés de trois ans (animaux N^{os} 1-2-3) infectés expérimentalement de manière persistante par la souche Pe 515 non cytopathogène du virus BVD (BROWNLIE *et al.*, 1984; MIGNON *et al.*, 1990) ont été étudiés. Un bovin non virémique, mais possédant des anticorps neutralisant le virus BVD a servi de témoin négatif (animal N^o 4). Ces animaux ont été maintenus dans les mêmes conditions d'élevage tout au long de l'expérience.

Prélèvements

Des prélèvements de sang sous anticoagulants (héparine-lithium) ont été réalisés chez les quatre animaux à intervalle régulier (15 jours) et toujours à la même heure.

Les échantillons ont ensuite subi différents traitements selon le type d'examen auquel ils ont été soumis. Les prélèvements destinés à la fluorocytométrie ont été testés extemporanément. Par contre, les échantillons destinés à l'immunofluorescence indirecte et à l'ELISA ont été traités au moment de la prise de sang et conservés à -80 °C, afin d'être testés en une seule manipulation. Pour l'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. Pour l'ELISA, 1 ml de sang a été additionné de 10 µl de NP40, incubé 10 min à température ambiante (T.A.), centrifugé 5 min à 10 000 g, pour conserver le surnageant comme antigène.

Anticorps

Seize anticorps monoclonaux produits contre la souche NY-1 non cytopathogène du virus BVD (anticorps NY-1 à NY-16) et 5 contre la souche OSLOSS cytopathogène (OSc-21 à OSc-25) ont été utilisés. Les anticorps NY-9 et NY-10 reconnaissent la glycoprotéine de

53kd, tandis que les 14 autres anticorps produits contre la souche NY-1 étaient spécifiques de la glycoprotéine de 48kd; les anticorps OSc-21 à OSc-25 précipitaient 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, 10, 15 et OSc-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 la cytométrie en flux et pour l'ELISA.

Détection du virus BVD dans le «buffy coat» par un test d'immunofluorescence indirecte

La présence de virus BVD dans le sang des 4 animaux étudiés a été vérifiée lors de chaque prélèvement 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 % CO₂-100 % 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 % H₂O. 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 80kd (OSc-25) du virus BVD, suivi d'un sérum de lapin anti-immunoglobulines de souris couplé à la fluorescéine (RAM-Fitc, Prosan).

Fixation et marquage pour la cytométrie en flux

La méthode employée a été empruntée à QVIST *et al.* (1990) et légèrement modifiée.

Cinq ml de sang hépariné ont été mélangés à un volume égal de PBS à T.A et l'anneau de cellules mononucléées a été récolté par centrifugation sur gradient de Ficoll-Paque (Pharmacia). Les leucocytes ont été lavés dans du PBS contenant 0,5 % de sérum de cheval, remis en suspension dans ce même tampon et comptés. Après centrifugation, les leucocytes ont été fixés pendant 5 min dans 10 ml d'une solution de PBS contenant 1 % de paraformaldéhyde (Sigma). Les cellules ont alors été centrifugées et lavées dans du PBS contenant 0,5 % de sérum de cheval et 0,1 % de saponine (Sigma) (PBS 0,5 % SC-sapo). Ensuite, environ 10⁶ cellules ont été incubées pendant 45 min à 37 °C dans 40 µl de PBS additionnés de 10 % de sérum de cheval et de 0,1 % de saponine et contenant 10 µg d'un mélange de 4 anticorps monoclonaux biotinés dirigés contre les protéines de 48kd (NY-6 et 8), 53kd (NY-10) et 80kd (OSc-23) du virus BVD. Les leucocytes ont ensuite été lavés dans du PBS 0,5 % SC-sapo et incubés pendant 20 min à 37 °C dans 50 µl de PBS 0,5 % SC-sapo contenant 2 µl de streptavidine conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (Amersham), puis lavées dans ce même tampon et remises en suspension dans du PBS pour la lecture au fluorocytomètre.

Cytométrie en flux

Le fluorocytomètre fournit des informations sur plusieurs paramètres par cellule analysée: la diffusion de la lumière incidente par la cellule («scattered light» ou «scatter») et l'émission de fluorescence. La cellule diffuse en effet la lumière incidente dans toutes les directions de l'espace et l'intensité lumineuse du «scatter» est fonction de la nature de la cellule et de l'angle d'observation. Aux petits angles d'observation, le «scatter» mesuré (FSC, ou «Forward Scatter») est proportionnel au volume cellulaire, tandis qu'à des angles très supérieurs (90 °), l'intensité mesurée (SSC, ou «Side Scatter») est fonction de paramètres de structure cellulaire, comme la granulosité des membranes. Si, en outre, la cellule possède une molécule cible, mise en évidence à l'aide d'anticorps et d'un fluorochrome, les sondes vont émettre une lumière de fluorescence, dont l'intensité est proportionnelle au nombre de fluorochromes fixés par la cellule. Comme plusieurs milliers de cellules sont analysées par seconde, l'écran montre une distribution en amas, chaque amas représentant une sous-population de cellules particulière;

cette visualisation des événements porte le nom de diagramme de dispersion ou «dot plot». Au niveau des diagrammes de dispersion, l'axe horizontal représente l'échelle des intensités de scatter, tandis que l'axe vertical représente l'échelle des intensités de fluorescence. Une fenêtre délimitant la zone à étudier peut en outre être placée sur le diagramme, et seuls les points tombant dans cette fenêtre seront pris en compte pour l'analyse.

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un FACS 440 (Becton Dickinson). Les cellules ont été enregistrées dans un diagramme d'acquisition selon deux paramètres: la déviation orthogonale et l'intensité de fluorescence. Trente mille leucocytes de chaque animal ont été collectés lors de chaque prélèvement. Une fenêtre a été placée au niveau de la population de cellules fluorescentes existant chez les animaux virémiques et pratiquement absentes chez le témoin négatif. Le pourcentage de cellules positives a été calculé en divisant le nombre de leucocytes se trouvant dans la fenêtre d'acquisition (cellules fluorescentes, associées aux antigènes viraux) par le nombre total de leucocytes accumulés (30 000).

ELISA sandwich

Le niveau d'infection des animaux a été quantifié par un ELISA sandwich, selon le protocole décrit par MIGNON *et al.* (1991).

Une combinaison de 2 anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine de 48kd du virus BVD a servi à la détection de l'antigène. Brièvement, 300 ng/puits de l'anticorps capteur (NY-15) ont été incubés une nuit à 4 °C; 100 µl/puits de l'antigène ont été incubés pendant 1h à T.A. Cent ng/puits de l'anticorps révélateur (NY-6) couplé à la biotine ont alors été incubés 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; le test a été réalisé en triple exemplaire pour chaque prélèvement. L'absorbance a été mesurée à 414 nm à l'aide d'un Titertek Multiscan 4 h après l'addition de l'ABTS.

Les antigènes ont été préparés lors des prélèvements, puis conservés à -80 °C. Les échantillons ont ensuite été testés

concomitamment, à l'aide d'un seul ELISA.

Formule leucocytaire

La numération leucocytaire (nombre de globules blancs par mm³) a été effectuée lors de chaque prélèvement; de même que la formule leucocytaire, évaluée sur un total de 300 leucocytes, a été déterminée sur des frottis sanguins fixés au méthanol et colorés à l'aide d'une solution de giemsa dans du PBS.

Les valeurs normales en ce qui concerne la formule leucocytaire chez les bovins sont les suivantes:

nombre de leucocytes/mm ³	
6 000 à 8 000	
pourcentages de lymphocytes	40 à 70
éosinophiles	< 5
neutrophiles	15 à 40
monocytes	3 à 10
basophiles	0 à 1

RESULTATS

Détection du virus BVD dans le «buffy coat» des animaux par un test d'immunofluorescence indirecte

La présence de virus BVD dans le sang des animaux a été vérifiée par un test d'immunofluorescence indirecte.

Lors du premier prélèvement, seul l'animal N° 1 s'est révélé positif; les trois animaux infectés de manière persistante étaient bien positifs lors des prises de sang suivantes; tandis que l'animal témoin est resté négatif tout au long de l'expérience (tableau 1).

TABLEAU 1
Détection du virus BVD dans le «buffy coat» par un test d'immunofluorescence indirecte

animal				
date du prélèvement	1	2	3	4
30-04 (N° 1)	+	-	-	-
14-05 (N° 2)	+	+	+	-
31-05 (N° 3)	+	+	+	-
14-06 (N° 4)	+	+	+	-
02-07 (N° 5)	+	+	+	-
12-07 (N° 6)	+	+	+	-

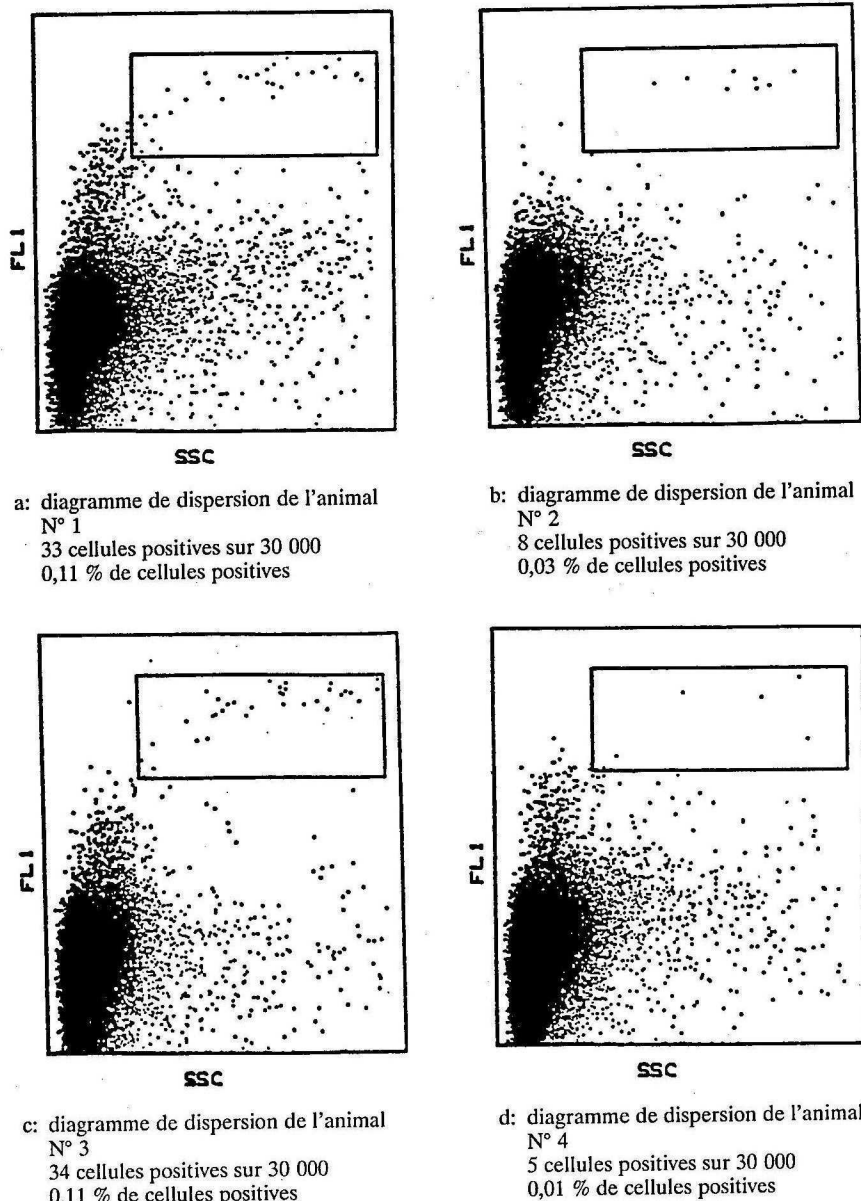


Figure 1
Diagrammes de dispersion correspondant au prélèvement N° 4. Une fenêtre a été placée au niveau de la population de cellules fluorescentes existant chez les animaux virémiques et pratiquement absentes chez le témoin négatif.

Détermination du pourcentage de leucocytes infectés par le virus BVD par cytométrie en flux

La figure 1 (a, b, c, d) correspond aux diagrammes de dispersion obtenus lors du 4ème prélèvement.

L'évolution au cours du temps du pourcentage de leucocytes associés au virus BVD est représentée dans la figure 2: les animaux N°s 1, 2 et 3 sont restés négatifs lors de la première prise de sang; l'animal N° 1 s'est révélé positif lors des 2ème, 3ème et 6ème prélèvements et les animaux N°s 2 et 3 lors du dernier prélèvement.

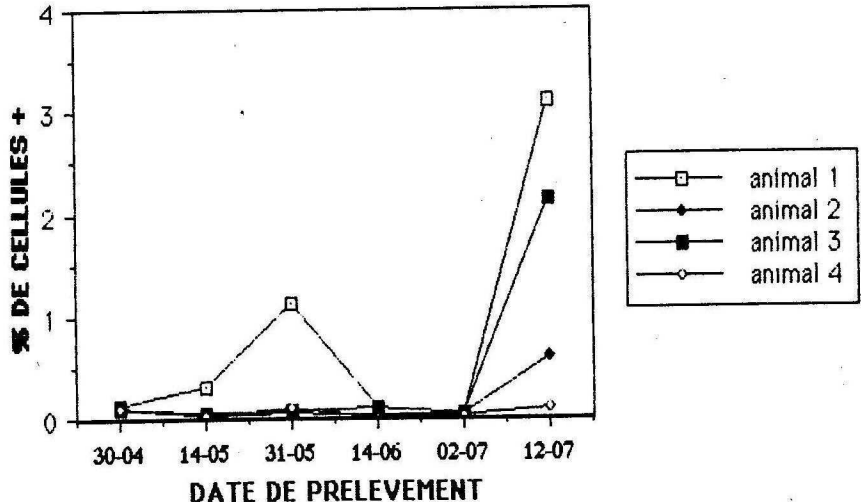


Figure 2
Evolution du pourcentage de leucocytes infectés par le virus BVD.

ELISA sandwich

Un ELISA sandwich a été réalisé en une seule manipulation sur tous les échantillons afin de quantifier le niveau d'infection des animaux. Trois mesures indépendantes de la densité optique ont été effectuées par échantillon; les résultats exposés à la figure 3 correspondent à la moyenne de ces 3 mesures.

Les résultats obtenus concordent avec ceux de l'immunofluorescence indirecte: seul l'animal N° 1 était positif lors du premier prélèvement, les trois animaux infectés de manière persistante se sont ensuite révélés positifs, tandis que l'animal témoin est bien resté négatif. Des variations de la densité optique ont pu être enregistrées entre les différents prélèvements.

Numération et formule leucocytaires

La formule leucocytaire complète a été établie pour chaque animal (tableau 2).

DISCUSSION

Les résultats des analyses effectuées par les différentes méthodes (immunofluorescence indirecte, cytométrie en flux et ELISA) démontrent la présence de fluctuations du taux d'infection chez les bovins infectés de manière persistante.

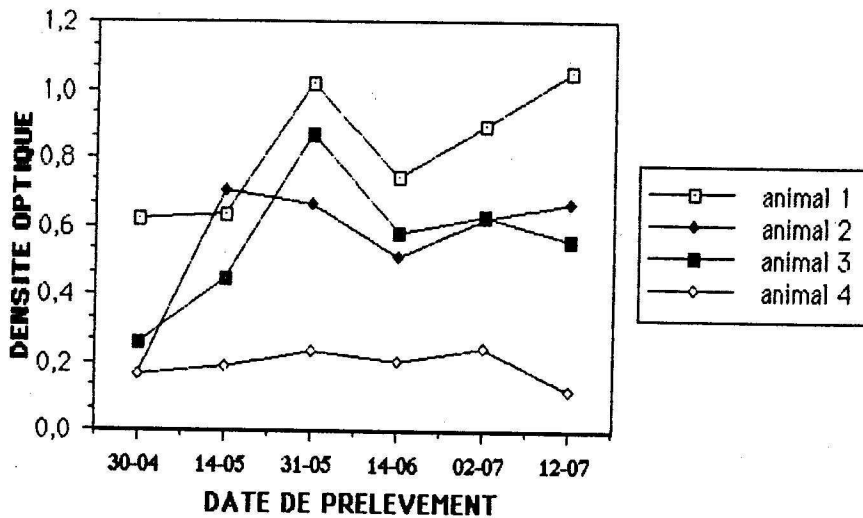


Figure 3
Evolution de la densité optique au cours du temps.

TABLEAU 2
Numération et formule leucocytaires

date prise de sang	animal				cellules
	1	2	3	4	
30-04	11 200	12 300	caillot	15 000	GB/mm ³
	22	31	32	34	% lympho
	6	18	19	4	% éosino
	61	44	40	52	% neutro
	11	7	9	10	% mono
14-05	0	0	0	0	% baso
	6 300	6 100	6 200	5 500	GB/mm ³
	42	45	35	41	% lympho
	6	27	15	4	% éosino
	42	23	44	49	% neutro
31-05	9	5	6	6	% mono
	1	0	0	0	% baso
	9 200	6 200	8 800	7 300	GB/mm ³
	50	38	34	42	% lympho
	14	26	20	8	% éosino
14-06	26	28	40	38	% neutro
	10	8	6	12	% mono
	0	0	0	0	% baso
	6 500	7 000	7 800	5 300	GB/mm ³
	58	59	45	62	% lympho
02-07	9	20	24	9	% éosino
	27	16	23	23	% neutro
	6	5	8	6	% mono
	0	0	0	0	% baso
	11 250	10 620	10 620	10 940	GB/mm ³
12-07	51	54	46	70	% lympho
	13	20	27	10	% éosino
	26	17	24	16	% neutro
	10	9	3	4	% mono
	0	0	0	0	% baso
12-07	7 800	6 800	7 200	6 800	GB/mm ³
	68	58	55	61	% lympho
	14	18	17	6	% éosino
	14	17	25	29	% neutro
	4	7	3	4	% mono
0	0	0	0	% baso	

formule leucocytaire complète des différents animaux a également été obtenue lors de chaque prélèvement, afin de déterminer s'il existe une relation entre le niveau d'infection et la numération leucocytaire ou le pourcentage de cellules d'une sous-population leucocytaire donnée.

Les trois animaux infectés de manière persistante étudiés dans cette expérience présentaient une numération leucocytaire normale, associée à des pourcentages de lymphocytes totaux et de monocytes sanguins également compris entre les valeurs normales. Par contre, ils montraient une nette éosinophilie alors que l'hypothèse d'une parasitose semble peu probable, puisque ces animaux ont toujours été élevés à l'étable (tableau 2). Ces résultats concordent avec ceux de BOLIN *et al.* (1985) et de BIELEFELDT *et al.* (1987), qui ont également démontré une numération leucocytaire normale chez les animaux infectés de manière persistante par le virus BVD. Par contre, ces auteurs ont enregistré des troubles au niveau de la formule leucocytaire de ces animaux. En effet, BOLIN *et al.* (1985) ont noté un pourcentage de lymphocytes B normal ou inférieur à la normale, tandis que les résultats de BIELEFELDT *et al.* (1987) présentaient un pourcentage de lymphocytes B normal ou augmenté et une augmentation du pourcentage de monocytes sanguins. Ces mêmes auteurs ont également enregistré une diminution du pourcentage de lymphocytes T circulants. Des résultats similaires ont également été rapportés par BURRELLS *et al.* (1989) chez des moutons infectés de manière persistante par le virus BD (Border Disease), qui présentaient une hyperplasie des lymphocytes B associée à une diminution du pourcentage de lymphocytes T circulants.

D'autre part, trois tests de détection du virus BVD ont été effectués, afin de mettre en évidence une éventuelle variation de l'antigénémie au cours du temps: un test d'immunofluorescence indirecte (le test de référence), un ELISA sandwich et une détection directe des antigènes vi-

raux au sein des leucocytes par cytométrie en flux. Les bovins Nos 2 et 3 se sont révélés négatifs (non virémiques) lors du premier prélèvement en ce qui concerne le test d'immunofluorescence indirecte (tableau 1) et l'ELISA (figure 3). Par cytométrie en flux, seul un pourcentage très faible de leucocytes infectés a pu être mis en évidence lors de ce même prélèvement chez les trois animaux (figure 2). Par ailleurs, le test d'immunofluorescence indirecte (tableau 1) et l'ELISA (figure 3) ont montré que les trois animaux infectés de manière persistante (Nos 1-2-3) étaient bien positifs (virémiques) lors des cinq dernières prises de sang, tandis que l'animal témoin (N° 4) est resté négatif tout au long de l'expérience. Des discordances sont apparues entre les résultats fournis par la cytométrie en flux d'une part et les deux autres tests de détection d'autre part. En effet, les animaux Nos 2 et 3 ne se sont révélés positifs par cytométrie en flux que lors du dernier prélèvement (figure 2), alors que ces deux animaux étaient bien positifs par immunofluorescence indirecte (tableau 1) et par ELISA (figure 3) lors des cinq dernières prises de sang. Ces observations peuvent cependant s'expliquer par une différence au niveau des échantillons testés par les trois méthodes. En effet, la détection virale par ELISA a été effectuée à partir de sang complet, tandis que le test d'immunofluorescence indirecte a été réalisé à partir du «buffy coat» des animaux, où l'on retrouve, outre des leucocytes, des globules rouges et du plasma. Par contre, la cytométrie en flux ne détecte que les antigènes viraux intra-leucocytaires. La présence de particules virales dans le plasma sanguin des animaux (CLARKE *et al.*, 1987) pourrait donc expliquer cette discordance au niveau des résultats.

QVIST *et al.* (1991) ont comparé la cytométrie en flux et la détection virale en culture de cellules pour l'identification des animaux infectés de manière persistante par le virus BVD; les animaux réellement infectés de manière persistante se sont révélés positifs par les deux méthodes. Par contre, ici, seul l'animal

N° 1 était positif par cytométrie en flux lors des cinq derniers prélèvements et l'animal N° 3 ne s'est montré positif que lors de la dernière prise de sang. Ce défaut de détection des antigènes viraux chez les animaux Nos 2 et 3 pourrait s'expliquer par un trop faible pourcentage de cellules positives chez ces animaux; les données de la littérature rapportent en effet que le pourcentage de leucocytes infectés chez les animaux virémiques persistants varie de 0,5 à 30 % (BIELEFELDT *et al.*, 1987; QVIST *et al.*, 1990), ce qui est nettement supérieur aux données enregistrées chez les animaux Nos 2 et 3 (figure 2).

Le fluorocytomètre fournit des informations sur plusieurs paramètres par cellule analysée: la diffusion de la lumière incidente par la cellule («scattered light» ou «scatter») et l'émission d'une fluorescence, dont l'intensité est proportionnelle au nombre de fluorochromes fixés par la cellule. Le «scatter» est proportionnel au volume cellulaire, de sorte que les cellules les plus fluorescentes, sélectionnées dans la fenêtré du diagramme de dispersion (voir figure 1: a, b, c, d) correspondaient, soit à de grands lymphocytes, soit à des monocytes; on considérera donc que la majorité des cellules associées aux antigènes du virus BVD étaient des monocytes. Les sous-populations leucocytaires infectées par le virus BVD ont été étudiées chez les animaux infectés de manière persistante; BIELEFELDT *et al.* (1987) ont en effet démontré une multiplication virale et une production de virus infectieux au sein des lymphocytes T et des monocytes, tandis que les lymphocytes B semblaient peu participer à la propagation virale au sein de l'organisme. Ces mêmes auteurs ont également observé, grâce à une technique de doubles marquages en immunofluorescence, la présence de virus BVD au sein des quatre grands groupes de cellules du sang périphérique: en effet, ils ont dénombré, parmi les cellules infectées, 20 % de lymphocytes T, 4 % de lymphocytes B, 24 % de monocytes et 53 % de cellules non T non B. Cependant, aucune relation entre le pourcentage de monocytes circulants et la propor-

tion de cellules infectées n'a pu être mise en évidence dans cette expérience. En effet, lors des prélèvements N° 1 et N° 3, les animaux ont présenté une monocytémie assez élevée (tableau 2), alors que seul l'animal N° 1 s'est révélé positif par cytométrie en flux (figure 2).

On peut conclure des résultats obtenus par les trois tests de détection que les animaux infectés de manière persistante par le virus BVD sont susceptibles de présenter des variations de l'antigénémie au cours du temps: seul l'animal N° 1 semblait virémique lors de la première prise de sang, alors que les animaux Nos 2 et 3 étaient négatifs par immunofluorescence indirecte (tableau 1), par cytométrie en flux (figure 2) et par ELISA (figure 3). D'autre part, grâce aux résultats quantitatifs fournis par la cytométrie en flux et par l'ELISA, des fluctuations du taux d'infection ont pu être détectées chez les bovins étudiés. En effet, la courbe de l'animal N° 1 correspondant au pourcentage de leucocytes infectés par le virus BVD (figure 2) et les courbes représentant l'évolution au cours du temps de la densité optique mesurée chez les trois animaux (figure 3) montraient un profil identique: les animaux Nos 1 et 3 présentaient un pic d'antigénémie lors du troisième prélèvement, l'animal N° 2 lors du deuxième prélèvement, tandis que le niveau d'infection de l'animal N° 1 était maximal lors de la dernière prise de sang (figures Nos 2 et 3). Dès lors, le défaut de détection du virus BVD lors du premier prélèvement pourrait être attribué à ces fluctuations de l'antigénémie. En effet, le niveau d'infection des animaux était en général relativement faible et, en raison des variations de l'antigénémie, il a pu descendre sous le seuil de détectabilité au moment du premier prélèvement.

Par ailleurs, MIGNON *et al.* (1990) ont démontré la très grande stabilité antigénique de la souche non cytopathogène Pe 515 du virus BVD chez trois veaux infectés expérimentalement de manière persistante par cette souche pendant une période de presque deux années. CORAPI *et al.* (1988) avaient également ob-

servé une absence de variabilité antigénique parmi différents isolats d'une même souche virale chez des animaux localisés dans une même ferme.

Donc, d'un point de vue qualitatif, chez les animaux infectés de manière persistante, les souches de virus BVD sont parfaitement stables, alors que des variations quantitatives du taux d'infection sont susceptibles d'être enregistrées. Ces fluctuations doivent être prises en considération lors de l'évaluation ou de l'utilisation des diverses techniques de détection des animaux porteurs asymptomatiques du virus BVD.

REMERCIEMENTS

Nos plus vifs remerciements vont à Maria LONCAR pour son excellente collaboration technique et 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

Variations of antigen levels in the blood of cattle experimentally persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.

Blood was collected at two weeks interval from three adult cattle persistently infected with the non cytopathogenic BVDV strain Pe 515, and from one non infected animal, as a negative control. Samples were analyzed by flow cytometry and by ELISA and the results were compared to those obtained by indirect immunofluorescence assay, the reference test. Monoclonal antibodies specific for 48, 53 and 80 kd proteins of BVDV were used in these assays.

Infectious rate variations have been recorded within the different blood collections, indicating that level of BVDV antigens may vary in time in the blood of cattle persistently infected with BVDV.

BIBLIOGRAPHIE

- ARCHBALD L.F. Isolation of bovine virus diarrhoea virus from the uterocervical secretion of a repeat breeder cow. *Vet. Med. SAC*, 1974, 12, 1540-1541.
- ARCHBALD L.F., ZEMJANIS R. Intrauterine infusion of the virus of bovine viral diarrhoea virus and artificial insemination in the cow at estrus. *Vet. Med. SAC*, 1977, 72, 221-225.
- BENNET R.M., DONE J.T. Control of the bovine pestivirus syndrome in cattle: a case for social cost benefit analysis. *Proc. Soc. Vet. Epid. prevent. Med. MV*, Trusfield, Edinburgh, 1986.
- BIELANSKI A., HARE W.C.D. Effect *in vitro* of bovine viral diarrhoea virus on bovine embryos with the zona pellucida intact damaged and removed. *Vet. Res. Comm.*, 1988, 12, 19-24.
- BIELEFELDT OHMANN H., RØNSHOLT L., BLOCH B. Demonstration of BVDV in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J. Gen. Virol.*, 1987, 68, 1971-1982.
- BOLIN S.R., Mc CLURKIN A.W., CORIA M.F. Effects of BVDV on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, 46, 884-886.
- 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. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.*, 1984, 114, 535-536.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOWARD C.J., POCOCCO D.H. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rec. Vet.*, 1987, 18, 157-166.
- BURRELLS C., NETTLETON P.R., REID H.W., MILLER H.R.P., HOPKINS J., Mc CONNELL I. Lymphocyte subpopulations in the blood of sheep persistently infected with border disease virus. *Clin. Exp. Immunol.*, 1989, 76, 446-451.
- CLARKE M.C., BROWNLIE J., HOWARD C.J. Isolation of cytopathic and non - cytopathic bovine viral diarrhoea virus from tissues of infected animals. In: Pestivirus infections of ruminants. J.W. HARKNESS, editor, *Office for Official Publications of the European Communities*, Luxembourg, 1987, 3-10.
- CORAPI V.V., DONIS R.O., DUBOVI E.J. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and non cytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *J. Virol.*, 1988, 62, 2823-2827.
- 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, 62, 449-451.
- FENTON A., ENTRICAN G., HERRING J.A., NETTLETON P.F. An ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of sheep persistently infected with border disease virus. *J. Virol. methods*, 1989, 27 (3), 253.
- GRAHN T.C., FAHNING M.L., ZEMJANIS R. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhoea virus. *J.A.V.M.A.*, 1984, 185, 429-432.
- MIGNON B., SCHWERS A., WAXWEILER S., BOULANGER D., DUBUISSON J., BROWNLIE J., PASTORET P.P. Etude de la stabilité antigénique d'une souche non cytopathogène du virus BVD chez des animaux infectés expérimentalement de manière persistante. *Ann. Méd. Vét.*, 1990, 134, 325-329.
- 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, 35, 177-188.
- 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 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. Congrès, société française de buiatrie; 6-7/11/1986. Paris. In: pestiviroses des ovins et des bovins: nouvelles connaissances, utilisation pour une stratégie de contrôle, 87-104.
- 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., LIESS B., FREY H.R., TRAUTWEIN G. Incidence and impact of persistent infections with BVD virus in the field. In: Pestivirus infections of ruminants. J.W. HARKNESS, editor, *Office for Official Publications of the European communities*, 1987, 133-145.
- QUIST P., AASTED B., BLOCH B., MEYLING A., RØNSHOLT L., HOVE H. Flow cytometric detection of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, 54, 469-472.
- QUIST P., HOVE H., AASTED B., MEYLING A. Comparison of flow cytometric and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with Bovine Viral Diarrhoea virus. *J. clin. Microb.*, 1991, 29, 660-661.
- 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-MD dans des lots de taurillons. *Ann. Méd. Vét.*, 1989, 133, 681-690.
- WHITMORE H.L., ZEMJANIS R., OLSON J. Effect of bovine viral diarrhoea virus on conception in cattle. *JAVMA*, 1981, 178, 1065-1067.