

Etude du statut virologique d'une vache séropositive envers l'herpèsvirus bovin de type 1 et séronégative envers la glycoprotéine gE

SCHYNTS F., LEMAIRE M., BERTRAND O., THIRY E.

Service de Virologie – Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège
B 43 bis, Sart-Tilman – B-4000 Liège, Belgique

RESUME. Des vaccins marqués destinés à faciliter le contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Infectious bovine rhinotracheitis; IBR) ont été introduits sur le marché. Il s'agit de vaccins délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine gE de l'herpèsvirus bovin de type 1 (Bovine herpesvirus type 1; BHV-1). Ces vaccins confèrent à l'animal vacciné un statut sérologique différent (IBR+,gE-) de celui d'un animal infecté par une souche sauvage de BHV-1 ou vacciné avec un vaccin non marqué (IBR+,gE+). Cet article présente le cas d'une vache n'ayant jamais été vaccinée, mais possédant malgré tout un statut sérologique identique à celui d'un animal vacciné avec un vaccin marqué (IBR+,gE-).

INTRODUCTION

Les vaccins délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine gE apportent une aide considérable dans la prophylaxie et le contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine (infectious bovine rhinotracheitis; IBR) provoquée par l'herpèsvirus bovin de type 1 (Bovine herpesvirus type 1; BHV-1). Ce nouveau type de vaccin répond aux critères d'innocuité et d'efficacité semblables aux vaccins préexistants (Strube *et al.*, 1996) tout en ayant un avantage supplémentaire. En effet, associés à un test de détection des anticorps dirigés contre la glycoprotéine délétée, ils permettent une discrimination sérologique entre animaux vaccinés (sérologiquement négatifs envers la glycoprotéine gE; gE-) et infectés naturellement (sérologiquement positifs envers la glycoprotéine gE; gE+), ce qui n'était pas possible avec les vaccins préexistants (tableau 1).

Tout animal infecté par une souche sauvage ou atténuee de BHV-1 de-

vient porteur latent. A tout moment, cet état latent peut être rompu. Ce phénomène appelé réactivation virale est généralement accompagné d'une réexcrétion virale (pour revue, Lemaire *et al.*, 1994). La délétion dans le gène codant pour la glycoprotéine gE n'empêche pas la souche vaccinale atténuée de s'établir à l'état latent chez l'animal. En effet, de l'ADN de BHV-1 a été détecté par amplification génique (polymerase chain reaction; PCR) au niveau des ganglions trijumeaux de veaux indemnes de BHV-1 inoculés par voie intranasale à l'aide de BHV-1 délété en gE (Van Engelenburg *et al.*, 1995). La réactivation et la réexcrétion d'une souche de BHV-1 délétée en gE à l'aide d'injections répétées de glucocorticoïdes est possible (Straub, 1996), mais est moins aisée qu'avec des souches virales non délétées en gE (Pour revue, Schynts *et al.*, 1998).

L'existence d'animaux faux négatifs envers la glycoprotéine gE constitue

un obstacle à un plan de lutte contre l'IBR basé sur une vaccination avec des vaccins délétés en gE. En effet, ce type d'animal sera considéré indemne de l'infection alors qu'il est porteur latent d'une souche de BHV-1. Plusieurs hypothèses permettent d'envisager l'apparition de tels animaux faux négatifs envers gE (IBR+, gE-).

- Un animal peut présenter une décroissance du taux d'anticorps anti-gE après primo-infection et, après quelques mois, devenir faux négatif envers cette glycoprotéine en restant séropositif envers le BHV-1 (IBR+, gE-). Cette situation est réversible car des accès de réactivation spontanés peuvent produire des réponses secondaires et rendre à nouveau l'animal séropositif envers la glycoprotéine gE.
- Le test de détection des anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE (test IDEXX®), utilisé actuellement, présente une sensibilité relative de 74% par rapport à la séronutralisa-

tion prise comme test de référence (100%) (Perrin *et al.*, 1996). Ce défaut de sensibilité empêche la détection d'un certain nombre d'animaux infectés de manière latente. En outre, il ne faut pas que la vaccination répétée à l'aide de vaccins marqués inhibe le développement d'une réponse humorale envers la glycoprotéine gE chez l'animal infecté par une souche sauvage de BHV-1. Une séroconversion envers la glycoprotéine gE est observée après épreuve virulente chez des veaux vaccinés deux fois (Strube *et al.*, 1996).

- Des animaux IBR+, gE- pourraient également être générés à la suite de l'infection par des souches sauvages de BHV-1 présentant une mutation ponctuelle au niveau de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal utilisé dans le test ELISA gE (test IDEXX®).

- Théoriquement, on peut aussi postuler l'existence sur le terrain de souches de BHV-1 naturellement délétées dans le gène codant pour la glycoprotéine gE.

Cet article présente le cas d'une vache possédant des anticorps envers le BHV-1, mais dépourvue d'anticorps anti-gE et n'ayant jamais été vaccinée. Cette étude permet de détailler le raisonnement à adopter pour l'interprétation d'analyses sérologiques difficiles qui seront rencontrées dans le cadre du contrôle de l'IBR.

MATERIEL ET METHODE

Une vache de 8 ans, de race Highland, appartenant au parc animalier de Han-sur-Lesse, a subi deux analyses sérologiques en 1996. La première a été réalisée aux centres de dépistage des maladies du bétail des provinces de Namur et du Luxembourg en juillet 1996 à l'aide des kits LSI® IBR gB et bovine rhinotracheitis virus gE antibody test kit, IDEXX®. La seconde a été réalisée 6 mois plus tard (décembre 1996) au service de Virologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège à l'aide des kits serelisa IBR/IPV Ab Bi test kit, RHONE MERIEUX® et bovine rhinotracheitis virus gE antibody test kit, IDEXX®. Dans les deux cas,

cette vache était séropositive envers le BHV-1 mais séronégative envers la glycoprotéine gE (IBR+, gE-) sans jamais avoir été vaccinée.

Dans le but de mettre en évidence la souche virale portée à l'état latent par cet animal, une réactivation expérimentale a été réalisée au mois de mai 1997 à l'aide de 5 injections intramusculaires de dexaméthasone (Fortecortine®) pendant 5 jours consécutifs, à la dose de 0,1 mg/kg.

Plusieurs techniques ont été utilisées de manière à mettre en évidence une réactivation virale:

Isolement et titrage viral par la méthode des plages de lyse

La mise en évidence de particules virales réexcrétées a été effectuée par la méthode des plages de lyses sur cellules Madin Darby Bovine Kidney (MDBK cells) à partir d'écouvillons nasaux prélevés dans 1ml de milieu essentiel minimum (MEM) pendant 13 jours consécutifs à partir du jour de la première injection de dexaméthasone (jour 0).

Détection d'ADN viral par PCR

La mise en évidence d'ADN viral par PCR a été réalisée à partir d'écouvillons nasaux prélevés dans 1ml de Nonidet P40 (NP 40) pendant 13 jours à partir du jour 0 de l'expérience. Le fragment d'ADN supportant une double amplification est situé dans le gène gC du BHV-1 (Schyns *et al.*, manuscrit en préparation).

Suivi sérologique

Deux tests commerciaux de type ELISA de détection des anticorps dirigés contre le BHV-1 ont permis d'apprécier l'évolution du statut sérologique de cet animal durant la réactivation aux jours 0, 14 et 21 (serelisa IBR/IPV Ab Bi test kit, RHONE MERIEUX®; bovine rhinotracheitis virus gE antibody test kit, IDEXX®). Un test de séroneutralisation (SN) a été effectué sur les mêmes sérum ainsi que sur le sérum analysé en décembre 1996 au service de Virologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège.

Investigation d'une réponse immune à médiation cellulaire à l'aide d'un test de production spécifique d'interféron γ .

Un test de production d'interféron γ (IFN- γ) spécifique du BHV-1 semblable à celui décrit par Godfroid *et al.* (1995) a été réalisé sur sang hépariné les jours 0, 14 et 21 de l'expérience.

RESULTATS

Juste avant le début des injections de dexaméthasone, cet animal ne présentait plus de réponse sérologique positive envers le BHV-1. Il est donc passé d'un statut IBR+ à un statut IBR-. Aucune particule virale infectieuse n'a pu être détectée par la méthode des plages de lyse dans les écouvillons nasaux durant les 13 jours suivant la première injection de dexaméthasone. De plus, la PCR n'a pu mettre en évidence aucun fragment d'ADN spécifique du BHV-1 dans les écouvillons nasaux prélevés durant la même période de temps.

Les analyses sérologiques effectuées aux jours 14 et 21 après le traitement à la dexaméthasone n'ont pas indiqué une augmentation des taux d'anticorps anti-BHV-1, ni par ELISA ni par SN. Le sérum prélevé en décembre 1996 a été analysé par SN. Ce sérum positif par la méthode ELISA s'est révélé négatif. Finalement, aucune réponse immune à médiation cellulaire par production spécifique d'IFN- γ n'a été mise en évidence.

La réactivation et réexcrétion de virus latent n'ont donc pu être mise en évidence par les différentes techniques utilisées.

DISCUSSION

Un test diagnostique possède deux valeurs intrinsèques, la sensibilité et la spécificité (Thiry et Pastoret, 1992). Il est donc possible qu'il donne des résultats faussement positifs ou négatifs par rapport à la situation réelle (tableau 2). En appliquant ce raisonnement aux résultats des tests sérologiques du cas exposé, quatre situations sont envisageables.

Premièrement, l'animal était vrai positif envers le BHV-1 et vrai négatif envers la glycoprotéine gE. Cet animal n'ayant jamais été vacciné, cela signifie qu'il était infecté par une souche sauvage ne possédant pas l'épitope reconnu par le test commercial IDEXX® au niveau de la glycoprotéine gE. La prévalence de souches sauvages déléées dans un épitope situé dans le gène codant pour la glycoprotéine gE étant extrêmement faible (Kaashoek *et al.*, 1996), cette possibilité semble peu probable. L'absence de réexcrétion et de réactivation virales après traite-

ment à la dexaméthasone ne permet cependant pas d'écartier complètement l'hypothèse d'un virus sauvage déléte en gE présent à l'état latent. En effet, ce type de souche est difficilement réactivable (Straub, 1996). La seule possibilité de vérifier cette hypothèse serait l'analyse par PCR des ganglions trijumeaux à la mort de l'animal.

Deuxièmement, l'animal était vrai positif envers le BHV-1 et faux négatif envers la glycoprotéine gE, à cause d'un manque de sensibilité relative du test de détection des anticorps anti-gE ou suite à une décroissance plus rapide du taux de ces mêmes anticorps après primo-infection. Dans ce cas, il serait porteur latent d'une souche de BHV-1 sauvage. Cependant, le virus aurait dû être isolé après traitement à la dexaméthasone ou du moins une augmentation du taux d'anticorps anti-BHV-1 aurait dû être observée. En effet, une conséquence directe de la réactivation virale, et parfois la seule détectable réside dans un effet anamnestique sur l'immunité spécifique de l'animal (Thiry *et al.*, 1983). Les résultats du test de production spécifique d'IFN- γ n'ont également pas pu mettre en évidence ce corollaire de la réactivation virale sur l'immunité spécifique de l'animal.

Troisièmement, l'animal est faux positif envers le BHV-1 et vrai négatif envers la glycoprotéine gE. Il serait donc indemne de l'infection et ne serait pas porteur latent du BHV-1. Il y aurait donc un manque de spécificité du test commercial ELISA utilisé. C'est en accord avec les résultats négatifs obtenus suite aux injections de dexaméthasone et avec l'analyse négative en SN d'un échantillon diagnostiqué positif par la méthode ELISA. Cette hypothèse ne peut donc être éliminée.

La dernière possibilité est que l'animal soit faux positif envers le BHV-1 et faux négatif envers la glycoprotéine gE. Il s'agirait ici d'une aberration, car un animal ne peut être immunisé contre la glycoprotéine gE sans avoir été infecté par le BHV-1. Théoriquement, cela serait possible si l'animal avait été immunisé avec un vaccin sous-unitaire qui n'exprimerait que cette glycoprotéine. Ce

type de vaccin n'existe pas. Cette dernière possibilité est donc écartée.

Le cas décrit ici s'apparente aux animaux dits «réacteurs uniques» («single reactors»; SR) qui ont notamment été identifiés dans des élevages indemnes du virus de la maladie d'Aujeszky (Pseudorabies virus; PRV) (Brown *et al.*, 1990; Annelli *et al.*, 1991). Un SR est défini comme le seul animal séropositif de l'ensemble d'un troupeau séronégatif. Ces porcs, apparemment non infectés de manière latente, possèdent néanmoins des séquences génomiques du PRV (Ros Bascunana *et al.*, 1997). Ce phénomène est donc différent d'une latence classique. Il faudra déterminer si cette situation originale existe aussi chez les bovins, en association au BHV-1 et si le cas rapporté dans cette article fait partie de cette catégorie d'animaux.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été rédigé dans le cadre d'une convention de recherche avec le Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture. Les auteurs tiennent à remercier la Société des grottes de Han-sur-Lesse. Ils remercient également le service de Médecine interne des grands animaux de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'ULg (Professeur F. Lomba) ainsi que les Drs J. Bughin du centre provincial de dépistage des maladies du bétail de la province de Luxembourg, H. Antoine du Centre d'économie rurale de Marloie et B. Limbourg du centre provincial de dépistage des maladies du bétail de la province de Namur. Finalement, ils remercient chaleureusement L. Nols, J.-P. Georgin et A. Brichaud.

SUMMARY

Study of the virological status of a cow seropositive against bovine herpesvirus type 1 and seronegative against gE glycoprotein

Marker vaccines aiming to facilitate infectious bovine rhinotracheitis (IBR) control are now available. These vaccines are deleted in

Tableau 1

Interprétation des résultats sérologiques obtenus à l'aide de tests théoriques, de sensibilité et de spécificité valant 100%, détectant les anticorps envers le BHV-1 et la glycoprotéine gE.

	gE positif	gE négatif
IBR positif	A	B
IBR négatif	C	D

A: IBR+, gE+:

- animal porteur latent d'une souche sauvage naturelle de BHV-1.
- animal vacciné avec un vaccin non marqué.
- animal porteur latent d'une souche sauvage naturelle de BHV-1 et vacciné avec un vaccin marqué ou non.

B: IBR+, gE-:

- animal indemne de l'infection, vacciné avec un vaccin déléte dans le gène codant pour la glycoprotéine gE.

C: IBR-, gE+:

- résultat sérologique peu probable qui résulterait d'un manque de sensibilité du test sérologique détectant les anticorps anti-BHV-1 et/ou d'un manque de spécificité du test sérologique gE.

D: IBR-, gE-:

- animal indemne de l'infection et non vacciné.

Tableau 2

Table de contingence décrivant les différents effectifs d'un échantillon de population selon les critères de présence ou d'absence d'infection et de réaction positive ou négative à un test sérologique.

Infecté par le BHV-1	Non infecté par le BHV-1
Test positif	VP
Test négatif	FN

VP: vrais positifs; FP: faux positifs;
FN: faux négatifs; VN: vrais négatifs

the gene encoding glycoprotein gE of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1). They allow a serological differentiation between vaccinated cattle

(IBR+, gE-) and cattle naturally infected or vaccinated with a non marker vaccine (IBR+, gE+). This paper deals with the case of a cow,

which, although never vaccinated, possessed the same serological response as cattle vaccinated with a marker vaccine (IBR+, gE-).

BIBLIOGRAPHIE

- ANNELLI J.F., MORRISON R.B., GOYAL S.M., BERGELAND M.E., MACKEY W.J., THAWLEY D.G. Pig herds having a single reactor to serum antibody tests to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, 1991, **128**, 49-53.
- BROWN T.M., OSORIO F.A., ROCK D.L. Detection of latent pseudorabies virus in swine using in situ hybridization. *Vet. Microbiol.*, 1990, **24**, 273-280.
- GODFROID J., WELLEMANS G., VAN OPDENBOSCH E., LETESSON J.-J. Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) diagnosis based on an in vitro Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) antigen-specific IFN- γ production. In: M. Schwyzer and M. Ackermann (Editors), Proc. 3rd. Cong. Eur. Soc. Vet. Virol. *Vet. Microbiol.*, 1995, 159-163.
- KAASHOEK M. J. Marker vaccines against bovine herpesvirus 1 infections. Thèse de Doctorat en Sciences Vétérinaires à l'Université d'Utrecht, 1996, 125-134.
- LEMAIRE M., PASTORET P.P., THIRY E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 167-180.
- PERRIN B., PERRIN M., MOUSSA A., COUDERT M. Evaluation of a commercial gE blocking ELISA test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet. Rec.*, 1996, **138**, 520.
- ROS BASCUNANA C., BJORNEROT L., BALLAGI-PORDANY A., ROBERTSSON J.-A., BELAK S. Detection of pseudorabies virus genomic sequences in apparently uninfected 'single reactor' pigs. *Vet. Microbiol.*, 1997, **55**, 37-47.
- SCHYNTS F., LEMAIRE M., BARANOWSKI E., THIRY E. La glycoprotéine gE de l'herpèsvirus bovin de type 1 et les nouveaux vaccins marqués. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 21-32.
- STRAUB O.C. Experience with two BHV-1 marker vaccines, Proceedings du 19^e congrès mondial de buiatrie, Edimbourg, 8-12 juillet 1996, **1**, 39-41.
- STRUPE W., AUER S., BLOCK W., HEINEN E., KRETZDORN D., RODENBACH C., SCHMEER N. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 181-189.
- THIRY E., BROCHIER B., LANSIVAL B., HANTON G., DERBOVEN G., PASTORET P.P. Réactivation du virus de la rhinotrachéite bovine (Bovine herpesvirus 1, BHV-1) non accompagnée de réexcrétion de particules infectieuses, après injection de dexaméthasone, chez des bovins préalablement soumis au test d'hypersensibilité retardée au BHV-1. *Ann. Méd. Vét.*, 1983, **127**, 377-381.
- THIRY E., PASTORET P.-P. L'évaluation des méthodes diagnostiques. *Ann. Méd. Vét.*, 1992, **136**, 269-272.
- VAN ENGELENBURG F.A., KAASHOEK M.J., VAN OIRSCHOT J.T., RIJSEWIJK F.A. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 2387-2392.