

Courte note

MISE EN ÉVIDENCE DU VIRUS BVD (BOVINE VIRAL DIARRHOEA VIRUS) DANS PLUSIEURS LIGNÉES CELLULAIRES

WELLEMANS G et VAN OPDENBOSCH E

Institut National de Recherches Vétérinaires, 99, Groeselenberg, B-1180 Bruxelles, Belgique

Reçu le 15 février 1986/Accepté le 13 juin 1986

Abstract

PRESENCE OF BOVINE VIRAL DIARRHOEA (BVD) VIRUS IN SEVERAL CELL LINES. — By specific fluorescent antibodies, it was shown that cell lines from bovine origin were contaminated with BVD virus. The same virus was also detected in cell lines from different species like horse, cat, monkey, rabbit, pig and sheep. The authors express their concern about the use of these cell lines as substrate for live virus vaccines.

L'infection chronique par le virus BVD (Bovine Viral Diarrhoea Virus) des lignées cellulaires bovines est bien connue sans qu'à notre connaissance, elle n'ait fait l'objet d'une publication.

Nous avons examiné toutes les lignées cellulaires utilisées dans notre laboratoire pour vérifier à nouveau la présence d'une infection chronique de nos lignées bovines, et surtout pour tester les lignées « non bovines » utilisées par les différents services de notre laboratoire.

L'intérêt de ce travail est de montrer la présence de virus BVD dans certaines lignées « non bovines » alors que celles-ci sont utilisées, ou préconisées, pour la fabrication de vaccins vivants en raison de la faible probabilité, pense-t-on, d'une infection par le virus BVD.

Matériel et Méthodes

A. Cultures cellulaires

1. Lignées cellulaires bovines

Dans notre collection conservée dans l'azote liquide, nous avons testé les cellules suivantes, pour lesquelles nous avions parfois plusieurs échantillons provenant de laboratoires différents : MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) : 10 origines différentes dont 4 commerciales. GBK (Georgia Bovine Kidney) originaires de 3 laboratoires différents.

AUBEK (Auburn University Bovine Embryo Kidney) : 2 lignées.

BTC (Bovine Turbinate Cells) : 2 lignées.

LRFB (Rein de fœtus bovin) est une lignée produite à l'INRV dont nous avons testé les 25^e et 125^e passages (P25 et P125).

BK4 et BKD : utilisées pour la production de vaccins vivants destinés aux bovins.

2. Lignées cellulaires « non bovines »

Nous avons examiné les lignées suivantes :

RP1 (rein de poulain) produite à l'INRV (P98)
PM (plexus de mouton) produite par l'INRV (P15)
CRFK (rein de chat)
VERO (rein de singe)
RK13 (rein de lapin)
HRT18 (human rectal tumor de Laporte)
SK6 (rein de porc)
PK15 (rein de porc)
MDCK (rein de chien)

Les différentes lignées ont subi un certain nombre de passages dans notre laboratoire. Lorsque le nombre est connu avec certitude, il est indiqué entre parenthèses. Le sérum utilisé pour la culture était du sérum de fœtus non traité d'origine commerciale.

Une contamination des lignées cellulaires « non bovines » par des cellules bovines est possible. Un sérum dirigé contre les cellules RFB et TV fut obtenu sur lapin par inoculations répétées d'une suspension de ces cellules dans du Freund incomplet. Ce sérum fut marqué à la FITC pour le contrôle direct sur lamelles.

3. Cultures cellulaires primaires et secondaires d'origine bovine.

Nous avons examiné, par contrôle direct uniquement, 102 cultures primaires de reins de fœtus bovins (RFB) et 56 cultures de testicules de veau (TV), au cours d'une période de 13 mois.

B. Recherche du virus BVD

1. Contrôle direct des cellules

Chaque lignée cellulaire subit un passage en tube Leighton et le tapis cellulaire a été ensuite examiné directement par le sérum anti-BVD fœtal marqué.

2. Contrôle indirect sur cellules négatives

Les lignées cellulaires furent mises en culture sur boîtes en plastique Falcon, dans un milieu MEM auquel avaient été adjoints 10% de sérum fœtal. L'absence de virus BVD avait été contrôlée et ce sérum avait subi en

Tableau 1 – Contrôle de la présence du virus BVD dans les lignées cellulaires de bovins et « non bovins » et dans les cultures primaires

Nature des cultures cellulaires	Nombre d'échantillons testés	Présence du virus BVD		Présence d'antigènes bovins (test IFD) ^a
		Test indirect	Test direct	
<i>Lignées bovines</i>				
MDBK	10	10	ND ^b	10
GBK	3	3	ND	3
AUBEK	2	2	ND	2
BTC	2	1	1	2
LRFB (25P)	1	0	0	1
LRFB (125P)	1	1	ND	1
BK4	1	0	0	1
BKD	3	0	0	3
<i>Cultures primaires bovines</i>				
RFB	102	ND	16	ND
TV	56	ND	19	ND
<i>Lignées « non bovines »</i>				
CRFK	1	1	1	0
VERO	2	1	1	0
RK 13	2	1	1	0
PK15	2	1	1	0
SK6	3	2	2	0
RPI(98P)	1	1	1	0
PM(15P)	1	1	1	0
HRT18	3	0	0	0
MDCK	1	0	0	0

a : Immunofluorescence directe

b : non déterminé

outre une irradiation (1 megarad). Dès confluence, soit après une incubation de 24 à 48 heures, le tapis cellulaire à contrôler était rincé 4 fois avec du sérum physiologique tamponné (PBS) en vue d'éliminer toute possibilité d'erreur due à la présence éventuelle, mais peu probable, du virus BVD dans le sérum foetal utilisé pour la culture. Un milieu riche en protéines mais dépourvu de sérum était ensuite ajouté (Earle + Lactalbumine + Yeast extract). La culture cellulaire était ensuite incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Un échantillon de surnageant (0,250 ml) était alors prélevé et introduit dans des tubes Leighton contenant une lamelle sur laquelle s'était développée une culture secondaire soit de RFB, soit de TV, cellules indemnes de virus BVD. Les lamelles étaient ensuite fixées dans l'acétone froid, après une incubation de 24 et 48 heures à 37 °C. Elles étaient ensuite traitées à l'aide d'un immunosérum monospécifique anti-BVD préparé sur fœtus et marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Van Opdenbosch *et al* 1983). Les lectures étaient faites au microscope à fluorescence.

Résultats

A. Lignées cellulaires d'origine bovine

Les résultats obtenus par le contrôle indirect sur cellules négatives sont présentés dans le tableau 1. On constate que, parmi les lignées cellulaires d'origine bovine, seules 3 lignées repré-

sentant 5 échantillons, ne sont pas contaminées par le virus BVD. Toutes les autres lignées d'origine bovine soumises à notre test se sont révélées infectées chroniquement par un virus BVD non cytopathogène.

Les cellules témoins, inoculées soit avec le sérum foetal soit le milieu de survie (ELY) sont restées négatives. D'autres cellules témoins, inoculées par 10 doses infectieuses pour culture de tissu (10 DICT50 %) des souches NADL et C24V ont présenté une fluorescence très nette après 24 et 48 heures d'incubation à 37 °C, démontrant ainsi la sensibilité de la technique utilisée.

Le contrôle du test direct réalisé sur la lignée elle-même fut relativement difficile pour les lignées d'origine bovine en raison du nombre important de cellules atteintes et du manque de contraste avec les cellules négatives.

B. Lignées cellulaires « non bovines »

Parmi les lignées « non bovines », plusieurs lignées cellulaires de porc, poulain, chat, lapin, singe et mouton étaient contaminées chroniquement par le virus BVD. La lignée CRFK (rein de chat) a présenté un léger effet cytopathogène

(CPE) mais nous ne pouvons l'attribuer avec certitude à l'infection du virus BVD.

La lecture directe des lignées « non bovines » fut, par contre, plus aisée particulièrement lorsqu'elle était effectuée après 24 h d'incubation.

Le test d'immunofluorescence n'a pas révélé la présence d'antigènes bovins dans les lignées « non bovines ».

C. Cultures primaires

L'examen direct de 102 cultures primaires de reins de fœtus bovins (RFB) et de 56 cultures primaires de testicules de veaux (TV) a mis en évidence une infection due au BVD dans respectivement 16 et 19 cas.

Discussion

Le contrôle de la présence de virus BVD dans les lignées cellulaires à l'aide du test indirect (infection de cultures cellulaires indemnes, par le surnageant des cultures testées) nous semble la technique la plus adéquate. Le contrôle direct, en effet, est relativement difficile en raison de la présence massive de cellules positives, et de la faible fluorescence des cellules atteintes par un virus BVD non cytopathogène. Par contre, le contrôle direct des lignées « non bovines » est plus aisé à cause du nombre plus restreint de cellules positives, du moins après 24 h d'incubation. Le contrôle direct des lignées cellulaires lorsqu'il est positif confirme les résultats obtenus par la méthode indirecte, excluant toute erreur de manipulation. En outre, le transfert du virus BVD à partir du surnageant de ces cultures cellulaires vers une culture cellulaire négative contrôlée, confirme que ce virus BVD est infectieux. Utilisant

des cellules de hamster et d'origine humaine, Fernélius (1969) n'avait obtenu qu'une infection abortive. La raison en est probablement la nature de la souche de virus BVD.

L'origine de ces infections chroniques à BVD est inconnue. Le sérum fœtal commercial (Kniassef *et al* 1975, Rossi *et al* 1980) pourrait assurer la contamination virale en raison de l'existence possible d'animaux porteurs du virus BVD *in utero* (Smithies *et al* 1975, Kent Lloyd *et al* 1985) et du nombre important de fœtus traités par lot de sérum.

Une stérilisation (irradiation, béta-Propiolactone) par conséquent, des sérums de fœtus est pour le moins à préconiser.

La fréquence d'infection par le virus BVD des cultures cellulaires primaires RFB (15 %) et TV (34 %) peut s'expliquer par la présence de ce virus dans le sérum fœtal utilisé pour la culture mais également par le fait que bon nombre de fœtus et de veaux sont des porteurs asymptomatiques du virus BVD.

En ce qui concerne les examens réalisés par le test d'immunofluorescence, ceux-ci confirment l'absence de contamination de nos lignées cellulaires non bovines par des cellules bovines, plus sensibles au virus BVD.

En conclusion, on constate que les lignées cellulaires provenant d'animaux aussi différents des bovins que le poulain, le chat, le porc, le lapin, le mouton et le singe, peuvent être chroniquement infectées par le virus BVD. Cette constatation est inquiétante du fait que certaines d'entre elles sont préconisées pour la fabrication de vaccins vivants (Anonyme 1985). Un contrôle permanent de ces lignées cellulaires est par conséquent indispensable.

Résumé

Les auteurs ont recherché la présence du virus BVD dans plusieurs lignées cellulaires tant bovines que « non bovines ». Ils ont constaté qu'un grand nombre de ces lignées cellulaires étaient infectées chroniquement par ce virus. Les auteurs s'inquiètent des conséquences de l'utilisation éventuelle de ces lignées cellulaires infectées par le virus BVD pour la fabrication de divers vaccins à virus vivants.

Références

- ANONYME, 1985. Harmonization of Rinderpest diagnosis. Workshop of the CEC, Maisons-Alfort, 17-18 June 1985
 FERNELIUS A, LAMBERT G, HEMNESS G, 1969. Bovine viral diarrhoea virus host cell interactions : adaptation and growth of virus in cell lines. *Am J Vet Res* 30:1561-1572
 KENT LLOYD KC, MORRIS DD, 1985. Bovine viral diarrhoea in a newborn calf. *J Am Vet Med Assoc* 186:600-601
 KNIAZEFF AJ, WOPSCHALL LJ, HOPPS HE, MORRIS CS, 1975. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. *In Vitro* 11:400-403

ROSSI CR, BRIDGMAN CR, KIESEL GK, 1980. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *Am J Vet Res* 41:1680-1681

SMITHIES LK, MODDERMAN E, 1975. BVD virus in commercial fetal calf serum and « normal » and aborted fetuses. *Proc Ann Meet AM Ass Vet Lab Diagn* 18:113-119

VAN OPDENBOSCH E, WELLEMANS G, BLONDEEL H, 1983. The production of monospecific antisera by intra-uterine inoculation of bovine fetuses. *VI Dierg Tijdschr* 52:95-106