

**IMPLEMENTATION D'UNE METHODE DE
DETECTION DU VIRUS DE LA DIARRHEE VIRALE
BOVINE (BVDV) AU SEIN DE LA FONDATION DE
PROMOTION DES PRODUCTIONS ANDINES
PROINPA (BOLIVIE)**

MARJOLAINE MARTIN

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNEE ACADEMIQUE 2009-2010

(CO)-PROMOTEUR(S) : R. RENAUVILLE, J. ROJAS (PROINPA- BOLIVIE)

Copyright © Gembloux Agro-Bio Tech, 2010.

Toute reproduction du présent document par quelque procédé que ce soit ne peut être autorisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et du doyen de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

**IMPLEMENTATION D'UNE METHODE DE
DETECTION DU VIRUS DE LA DIARRHEE VIRALE
BOVINE (BVDV) AU SEIN DE LA FONDATION DE
PROMOTION DES PRODUCTIONS ANDINES
PROINPA (BOLIVIE)**

MARJOLAINE MARTIN

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNEE ACADEMIQUE 2009-2010

(CO)-PROMOTEUR(S) : R. RENAUVILLE, J. ROJAS (PROINPA- BOLIVIE)

Remerciements

Cette page est dédiée à ceux qui, chacun à leur manière, en Bolivie, en Belgique ou en France, m'ont apporté leur aide et leur soutien tout au long de la réalisation de mon mémoire.

Un merci tout particulier au Professeur Renaville, pour son encadrement et sans qui la réalisation de ce mémoire et de ce voyage n'aurait pas été possible. Merci également au Dr. Jorge Rojas Beltran pour son accueil et le récit de ces aventures d'un bolivien en Belgique. Jorge, désolé pour toutes les frayeurs et mille mercis pour les découvertes et les fous rires.

Merci au Dr. Gandarillas et aux membres de PROINPA pour leur accueil au sein de la fondation. Merci à Silene pour sa patience et à sa famille pour son hospitalité, à Ariel, Cristian et Jhonatan pour leur aide sur le terrain, à Anita et Andrea pour leur amitié et les « chicas nights », à Abel, Lucy et Kati pour leur gentillesse, à Fidele pour sa sagesse et à Gabriella pour ses conseils. Sans oublier Don Mario, el señor del comedor, Jenny, et bien sur Montcha. Merci encore au Dr. Alejandro Bonifacio pour son accueil et hébergement au sein de la communauté de Quipaquipani, ainsi qu'à Helena, Marlene etc... pour leur aide précieuse lors des prélèvements sanguins sur les lamas.. Que aventura !

Encore un merci particulier à la Granja Modelo Pairumani et el ingenior José Sanchez ainsi qu'aux éleveurs Don y Donna Gabriel pour leur confiance.

Le voyage réalisé dans le cadre du présent travail a été rendu possible grâce à l'intervention financière du Conseil interuniversitaire de la Communauté française de Belgique - Commission universitaire pour le Développement - Rue de Namur, 72-74, 1000 Bruxelles - www.cud.be.

En France, merci à LSI et en particulier à Eric Sellal pour son aide et à Stéphanie Collin pour sa patience et sa disponibilité.

En Belgique, merci à Olivier Duterme, à Laetitia et les autres membres de Progenus pour leur aide et leurs précieux conseils. Merci à l'Unité de Biologie animale et microbienne pour leur accueil, leur gentillesse et... leur lyophilisateur.

Un merci spécial à Delphine Jaunard et Maud Evrard pour cette aventure inoubliable, pour leur soutien moral et leur encouragement et pour toutes ces choses qu'on a découvertes (merci surtout pour ToroToro). Viva Pelluci y el diablo!

Merci aussi aux autres TFistes pour ces mercredis de folies et surtout pour leur réconfort, après tout, qui peut mieux comprendre un TFiste qu'un autre TFiste... ? Merci particulièrement aux éleveurs de 2ème Master pour leur amitié, leurs longs mails et leur soutien venant de Belgique, de France ou d'Afrique.

Enfin merci à mes proches de m'avoir encouragé et de m'avoir laissé faire ce voyage: Merci à Quentin, Maman, Papynou, mon frère et mes sœurs.

La diarrhée virale bovine est une maladie induite par le Bovine Virale Diarrhea Virus (BVDV) et est répartie mondialement. Un troupeau infecté par ce virus mènera inévitablement à des pertes économiques. C'est pourquoi la détection du virus et l'éradication des animaux porteurs, animaux infectés et immunotolérants (IPI), dans les troupeaux sont importants. En Bolivie, des troupeaux de bovins ont été détectés comme infectés en 2009 et dans d'autres pays andins, il a été découvert que ce virus peut également infecter les lamas et les alpagas.

L'implémentation d'une méthode de détection du BVDV dans les troupeaux de bovins et de lamas, au sein de la fondation PROINPA a été tentée. Pour ce, des méthodes immunologiques et moléculaires étaient combinées afin de profiter des avantages de chacune. Une ELISA anti-anticorps permettait de détecter une circulation virale préalable au sein des troupeaux et une analyse PCR en pool de faire un *Screening* rapide. Les pools positifs devaient ensuite être analysés, soit par une analyse qPCR de chaque échantillon, soit par deux ELISA anti-antigènes à 3 semaines d'intervalle sur chaque animal du pool, afin de détecter la présence d'animaux IPI ou d'animaux en virémie transitoire.

Du point de vue de l'infrastructure, tout le matériel nécessaire à la réalisation de ces deux types d'analyses était disponible. Mais des problèmes de logistique ont été rencontrés lors des analyses moléculaires. Les kits moléculaires semblent avoir été endommagés et dégradés lors du voyage Belgique-Bolivie. En effet, ces kits doivent se conserver à -20°C, et malgré les précautions prises, la durée du trajet (10 jours) Belgique-Bolivie était trop importante et a conduit à la dégradation des kits de détection moléculaire, conclusion tirée suite à l'échec de la totalité des analyses moléculaires.

De retour en Belgique, l'élaboration d'un kit de détection moléculaire pouvant se conserver à température ambiante a donc été tentée. Si les séquences BVDV, l'EPC et l'IPC ont très facilement pu être lyophilisées, il n'en est pas de même pour le Master MIX (contenant la Taq Polymérase (Taq)) et la Reverse Transcriptase (RT). Les « *illustra Ready-To-Go™ RT-PCR Beads* » de GE Healthcare sont des billes de Taq et de RT et se conservent à température ambiante. Nous avons donc tenté de combiner ces billes avec une partie du kit de LSI lyophilisée (séquences BVDV, EPC et IPC) pour former un kit moléculaire permettant la détection du BVDV et qui décomposé se conserve à température ambiante. Hélas, ces billes n'ont pas fonctionné avec les séquences BVDV et le cycle de températures utilisés dans le kit *BVDV-Screening* de LSI. Cependant différentes analyses ultérieures sur le design des primers, le cycle de températures, la concentration en sels des billes,... permettraient peut-être de faire fonctionner les billes.

An animal infected by the Bovine Viral Diarrhea Virus will have diarrheas, which can lead to milk production reduction, reproduction problems (and particularly abortion problems) and general weakness. This all leads to an economic loss. This is why the virus detection and the carriers, or Persistently Infected (PI) animals, eradication are important. If the virus presence was previously suspected in Bolivia, since 2009 it is certain that there is BVDV infection and the prevalence is high in comparison with others areas. Furthermore, this virus can also infect « New Worlds camelids » which are the alpacas, lamas, vicunas and guanacos species living in South-America.

The aim of this study was to implement a BVDV detection method for the Foundation of Andeans Productions Promotion PROINPA in Bolivia. This objective was first met by a prevalence evaluation of the virus using ELISA anti-antibodies analysis. Then, a screening of the tested herds containing animals with a positive serology was done by real-time PCR and finally the PI animals were detected by individual real-time PCR analysis or by two ELISA anti-antigens analysis's in a 3 week's interval.

There was no problem from an infrastructure viewpoint; the laboratories have all the necessary material and equipment and the labor was qualified for both analyses. But the logistic part was more difficult, because the molecular kit has to be preserved at minus twenty degrees. And this kit took 10 days to arrive from Belgium. Because none of the molecular analysis's succeeded, we concluded that the kit had been damaged during the travel and had been degraded.

The kit conservation conditions seemed to be a problem and that is why the elaboration of a new lyophilized kit was tried in Belgium. The lyophilisation of the BVDV sequences, the IPC and EPC was easy but wasn't possible for the Master MIX (containing the Taq Polymerase (Taq)) and the Reverse Transcriptase (RT).

The « Illustra Ready-To-Go™ RT-PCR Beads », from GE Healthcare, are beads made of Taq and RT that can be stored at room temperature. The combination of a lyophilized part of the LSI kit (BVDV sequences, EPC and IPC) with those beads will lead to a molecular BVDV detection kit that can be stored at room temperature. However, this combination doesn't seem to work. This can be due to a lot of different things like the incompatibility between the primers size and design and the Taq, the temperature activities of the Taq and the RT, the salt concentration, etc. In conclusion, different experiments are required to finalize a qPCR kit resistant to long trip conditions.

La diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad viral que se encuentra en todo el mundo. Esta enfermedad disminuye la producción de leche y causa diarreas muy importantes que pueden provocar abortos, es por eso que esta enfermedad ocasiona pérdidas económicas significativas. Por esta razón, la detección del virus y la erradicación de los portadores son muy importantes. En Bolivia, desde 2009, el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) se ha observado en 15 hasta 30 % de los hatos, esta prevalencia es muy importante en comparación a otros países del mundo.

El objetivo de este trabajo fue el de introducir una metodología de detección del VDVB para los hatos de bovinos y de llamas en Bolivia. En esta prospectiva, se han combinado métodos de detección inmunológica y molecular. El método ELISA anti-anticuerpos permitió detectar si el virus circuló por el hato y el análisis de PCR en tiempo real, de grupos de 20 individuos, permitió hacer un “screening” rápido. Posteriormente, los grupos positivos fueron analizados por PCR individual o por dos ELISAs anti-antígenos a 3 semanas de intervalo para detectar la presencia de animales IPI o virémicos transitorios.

Todo el material para realizar los dos tipos de análisis estaba disponible. Sin embargo, se encontró problemas de logística para los análisis moleculares. Al parecer los kits de detección molecular, los cuales se conservan a -20°C, se han dañado durante el viaje de Bélgica a Bolivia (10 días) porque ningún análisis funcionó. Postulamos la hipótesis que los kits moleculares se deterioraron durante el viaje y es por esta razón que no funcionaron.

De regreso a Bélgica, se trató de elaborar un kit de detección molecular de la BVDV que se pueda conservar a temperatura ambiente. Las secuencias de la VDVB, el EPC y el IPC no perdieron sus propiedades al ser liofilizadas. Sin embargo, no se obtuvo el mismo resultado cuando se liofilizó el Master MIX (conteniendo la Taq Polimerasa (Taq) y la enzima Transcriptasa inversa (RT)). El kit « *illustra Ready-To-Go™ RT-PCR Beads* » de GE Healthcare son micro-partículas que contienen Taq y RT que se pueden guardar a temperatura ambiente. Intentamos combinar estas micro-partículas con un parte del kit BVDV-Screening de LSI liofilizados (secuencias VDVB, EPC y IPC) afín de elaborar un kit molecular para la detección de la VDVB capaz de conservarse a temperatura ambiente. Esta combinación no funcionó con las secuencias VDVB y los ciclos de temperaturas utilizados en el kit *BVDV-Screening* de LSI.

INTRODUCTION	1
PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
<i>Chapitre 1 : La Bolivie et son plan sanitaire appliqués aux troupeaux de ruminants</i>	
1. INTRODUCTION	2
1.1 Généralités	2
1.2 Histoire et indépendance	4
1.3 Situation socio-économique	4
1.4 L'agriculture et l'élevage	5
2. LE CONTROLE SANITAIRE	6
2.1 Les problèmes sanitaires	7
2.2 Structures sanitaires mises en place	7
3. LES PATHOLOGIES ANIMALES EN BOLIVIE	8
<i>Chapitre 2 : Le virus de la diarrhée virale bovine</i>	
1. CONTEXTE HISTORIQUE ET SITUATION ACTUELLE	9
2. DESCRIPTION DU VIRUS BVD	9
3. PATHOGENIE ET EPIDEMIOLOGIE	11
3.1 Généralités	11
3.2 Les infections intra-utérines induites par le BVDV	12
3.3 La maladie des muqueuses (MD) suite à une infection au BVDV	13
4. IMPACTS ECONOMIQUE ET FINANCIER INDUITS PAR UNE INFECTION AU BVDV	14
4.1 Calcul du risque d'insertion d'un animal infecté dans une population	14
4.2 Quantification des pertes économiques	15
<i>Chapitre 3 : Mise en évidence du BVDV</i>	
1. INTRODUCTION	16
2. L'ISOLATION D'UN VIRUS	16
3. LE TEST ELISA	16
3.1 Introduction	16
3.2 ELISA bloquant les Anticorps (Blocking ELISA)	17
3.3 ELISA capteur d'Antigènes (BVD antigen capture)	18
3.4 L'ELISA et le BVDV en pratique	18
4. LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE	19
4.1 Introduction	19
4.2 La Reverse Transcriptase-PCR	20
4.3 La PCR en temps réel ou PCR quantitative	20
4.4 Définitions clés pour l'interprétation des résultats	22
4.5 la PCR et le BVDV en pratique	25
5. COMPARAISON DES 3 METHODES	26

Chapitre 4 : Lutte et contrôle du BVDV

1. PROGRAMMES DE CONTROLE ET D'ERADICATION	28
1.1 Déroulement d'un programme de contrôle et de prévention	28
1.2 Quid des programmes d'éradication ?	30
1.3 Coût d'un programme de contrôle et d'éradication	32
2. LA VACCINATION	32

PARTIE 2 : OBJECTIFS 33

PARTIE 3 : MATERIEL ET METHODES

1. INTRODUCTION	34
2. LES TROUPEAUX ET LA REGION	34
3. PRISE D'ECHANTILLON	34
4. PREPARATION DES ECHANTILLONS ET CONSERVATION	35
5. ELISA DE COMPETITION ANTI-ANITCOPRS	36
5.1 Objectifs	36
5.2 Principe	36
5.3 Méthode	36
6. ELISA DE TYPE SANDWICH ANTI-ANTIGENES	37
6.1 Objectif	37
6.2 Principe	37
6.3 Méthode	37
7. BVDV-SCREENING DE TOUT LE TROUPEAU PAR QPCR	38
7.1 Objectif	38
7.2 Principe	38
7.3 Méthode	38
8. QPCR FAST-IPI INDIVIDUELLE	40
8.1 Objectif	40
8.2 Principe	40
8.3 Méthode	40

PARTIE 4 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 1 : Contrôle préalable des kits de détection moléculaire du BVDV

1. INTRODUCTION	41
2. ESSAI DU KIT BVDV-SCREENING PRODUIT PAR LSI	41
3. ESSAI DU KIT FAST-IPI PRODUIT PAR LSI	42

Chapitre 2 : Analyses immunologiques et moléculaires réalisées en Bolivie

1. INTRODUCTION	43
2. PREMIERE ANALYSE ELISA BLOQUANT LES ANTICORPS	43
3. ANALYSES MOLÉCULAIRES SUR LES TROUPEAUX ET LES ANIMAUX SÉRONÉGATIFS	44
3.1 Premier test qPCR BVDV-Screening	44
3.2 Deuxième test qPCR BVDV-Screening	47
3.3 Troisième test qPCR BVDV-Screening	48
3.4 Quatrième test BVDV-Screening	49
3.5 Cinquième test BVDV-Screening	50
3.6 Premier test FAST-IPI	51
3.7 Deuxième Test FAST-IPI couplé à un test BVDV-Screening	53
3.8 Troisième test FAST-IPI	55
3.9 Conclusion pour les analyses moléculaires	56
4. ANALYSE IMMUNOLOGIQUES COMPLEMENTAIRES	57
4.1 Detection des animaux séronégatifs par ELISA anti-anticorps	57
4.2 Dernier test ELISA anti-anticorps	58
4.3 Premier TEST ELISA anti-antigènes	59
5. ANALYSES RÉALISÉES SUR DES ÉCHANTILLONS DE SANG DE LAMAS	59
5.1 Les lamas: un reservoir potentiel à BVDV	59
5.2 Analyses immunologiques	60
A) ANALYSE ELISA ANTI-ANTICORPS	60
B) ANALYSE ELISA ANTI-ANTIGENE	61
5.3 Analyses moléculaires	61
A) TEST QPCR BVDV-SCREENING	62
B) TEST QPCR FAST-IPI	62

Chapitre 3 : Analyses FAST-IPI supplémentaires réalisées en Belgique 63

Chapitre 4 : Kit de détection moléculaire du BVDV se conservant à température ambiante

1. INTRODUCTION	64
2. LYOPHILISATION DES DIFFERENTS COMPOSANTS DU KIT	64
3. UTILISATION DES « ILLUSTRATED READY-TO-GO RT-PCR BEADS » DE GE HEALTHCARE	65

Chapitre 5 : Recherche d'une méthode de détection du BVDV efficace, rapide et peu coûteuse

1. INTRODUCTION	68
2. DETECTION PAR DES METHODES IMMUNOLOGIQUES (TEST ELISA)	69
3. DETECTION PAR DES METHODES MOLECULAIRES (QPCR)	70
4. COMBINAISON DES METHODES IMMUNOLOGIQUES ET MOLECULAIRES	71
5. LA METHODE EFFICACE, RAPIDE ET PEU COUTEUSE	72

PARTIE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 73

Liste des figures

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Les précipitations en Bolivie.....	2
Figure 2 : Carte géographique de la Bolivie.....	3
Figure 3 : Représentation du génome des virus du genre Pestivirus	10
Figure 4 : Multiplication d'un virus ARN+	verso page 9
Figure 5 : infection par le BVDV aux différents stades de gestation	verso page 11
Figure 6 : Deux voies différentes d'obtention de veaux IPI	verso page 11
Figure 7 : Epidémiologie de la diarrhée virale bovine et de la maladie des muqueuses	9
Figure 8 : Représentation des zones les plus importantes du génome du BVDV pour la détection	17
Figure 9 : ELISA de compétition de type directe	17
Figure 10 : ELISA en sandwich de type directe	18
Figure 11 : La Réaction de Polymérisation en Chaîne	19
Figure 12 : Principe de la PCR transcriptase inverse	20
Figure 13 : Evolution de la fluorescence (nombre d'amplicons) d'une PCR au cours des cycles	21
Figure 14 : La technologie Taqman.....	verso page 20
Figure 15 : Droites étalons obtenues pour cinq molécules différentes.....	22
Figure 16 : Courbes cinétiques d'une PCR en temps réel.....	24

PARTIE 3 : MATERIEL ET METHODES

Figure 1 : Prise de sang sous la queue (vache).....	35
Figure 2 : Prise de sang au niveau de la jugulaire (lama).....	35
Figure 3 : Prise de sang au niveau de la cuisse intérieure (lama).....	35
Figure 4 : Echantillons de sang avant centrifugation	35
Figure 5 : Centrifugeuse	35
Figure 6 : Echantillons de sang après centrifugation (plasma et sérum).....	35
Figure 7 : Plaque ELISA avant la lecture.....	36
Figure 8 : Lecteur ELISA	36

PARTIE 4 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure 1 : Courbes d'amplification (obtenue avec un BVDV-Screening) <u>d'un pool confectionné à partir de 20 plasma , tous négatifs</u>	41
Figure 2 : Courbes d'amplification (obtenue avec un BVDV-Screening) d'un <u>pool confectionné à partir de 20 plasma dont un était positif pour le BVD</u>	41
Figure 3 : Courbe d'amplification (obtenue avec une analyse FAST-IPI) d'un échantillon <u>non détecté comme IPI</u> ...	42
Figure 4 : Courbe d'amplification (obtenue avec une analyse FAST-IPI) d'un échantillon <u>détecté comme IPI</u>	42
Figure 5 : Différence entre les courbes d'amplification des veaux IPI et des veaux en virémie transitoire	42
Figure 6 : Courbe d'amplification de la 3ème analyse FAST-IPI.....	56
Figure 7 : Représentation schématique de la structure conventionnelle d'un IgG (Immunoglobuline G) avec une chaîne lourde et une chaîne légère (à Gauche) et un anticorps à structure unique rencontrés chez les camélidés	60
Figure 8 : Multicomponent Plot du test des Illustra Ready-to-Go PCR beads avec les séquences BVDV, l'EPC et l'IPC.....	66
Figure 9 : Légende pour les figures 8, 9 et 10 de ce chapitre.....	66
Figure 10: Multicomponent Plot obtenu pour un EPC amplifié avec le kit BVDV-Screening de LSI.....	66
Figure 11: Multicomponent Plot obtenu pour un NCS amplifié avec le kit BVDV-Screening de LSI	66

Liste des tableaux

PARTIE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1: Principaux indicateurs économiques pour la Bolivie	5
Tableau 2: Probabilité de risque d'insertion d'un animal PI	14
Tableau 3: Type de fluorescents et exemples	25
Tableau 4: Dilutions d'un plasma animal IPI (positif en Ag) dans du plasma BVDV Ag négatif et BVDV <u>Ac positif</u>	26
Tableau 5: Dilutions d'un plasma animal IPI (positif en Ag) dans du plasma BVDV Ag négatif et BVDV <u>Ac négatif</u>	26
Tableau 6: Comparaison de l'isolation virale, de l'ELISA et de la qPCR pour la détection du BVDV	27
Tableau 7: Diagnostic des signes cliniques majeurs d'une infection au BVDV	29

PARTIE 3: MATERIEL ET METHODE

Tableau 1: Interprétation des résultats obtenus par une analyse ELISA anti-anticorps	37
Tableau 2: Interprétation des résultats obtenus par une analyse ELISA anti-anticorps	38
Tableau 3: Rendement moyen d'extraction d'ARN avec le kit "Quiagen RNeasy Mini-kit"	38
Tableau 4: Valeurs de l'EPC et du NCB attendues pour la validation de la qPCR <i>BVD-Screening</i>	39
Tableau 5: Interprétation des résultats de l'analyse qPCR <i>BVD-Screening</i> et statut de l'animal en regard du BVDV	39
Tableau 6: Interprétation des résultats de l'analyse qPCR <i>Fast-IPI</i> et statut de l'animal en regard du BVDV	40

PARTIE 4: RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 1: Résultats de la première ELISA Anti-Anticorps sur les animaux de la Granja de Pairumani	43
Tableau 2: Résultats de la première ELISA Anti-Anticorps sur les animaux de la Granja de Don Gabriel	43
Tableau 3: Résultats du premier <i>BVDV-Screening</i> sur les animaux de la Granja Pairumani	45
Tableau 4: Résultats du 2ème <i>BVDV-Screening</i> pour les pools D, E, F, G de la Granja Pairumani	47
Tableau 5: Résultats du 3ème <i>BVDV-Screening</i> pour les Pool I et J	48
Tableau 6: Résultats du 4ème <i>BVDV-Screening</i> pour les pools D, E, F, G, H, I, J	49
Tableau 7: Résultats du 5ème <i>BVDV-Screening</i> pour les vaches 3546 et 3450	50
Tableau 8: Résultats du premier test FAST-IPI pour les pools D, E, F, G, H, I, J	51
Tableau 9: Résultats du premier test FAST-IPI pour la vache 3450 et les veaux 3690, 3701 et 3704	51
Tableau 10: Résultats du deuxième test FAST-IPI couplé à un test BVDV-Screening	54
Tableau 11: Résultats du dernier test FAST-IPI (combinaison des deux kits)	55
Tableau 12: Résultats de la deuxième ELISA anti-anticorps pour les animaux des deux exploitations	57
Tableau 13: Résultats du dernier test ELISA Anti-Anticorps pour les animaux séronégatifs	58
Tableau 14: Résultats du premier test ELISA capteur d'antigènes pour les animaux séronégatifs	59
Tableau 15: Résultats du test ELISA anti-anticorps pour les deux troupeaux de lamas	60
Tableau 16: Résultats du test ELISA capteur d'antigènes pour les 2 troupeaux de lamas	61
Tableau 17: Résultats du test BVDV-Screening pour le pool de lamas (pool K)	62
Tableau 18: Résultats du test FAST-IPI sur un lama de chacune des 2 exploitations	62
Tableau 19: Résultats de l'analyse FAST-IPI réalisée en Belgique sur les échantillons de taureaux et de veaux de la Granja Pairumani à sérologie négative	63
Tableau 20: Résultats de l'analyse FAST-IPI réalisée en Belgique sur les échantillons de plasma des lamas de la communauté de Quipaquipani présentant des signes subcliniques de la BVD	63

Liste des tableaux

Tableau 21: Composantes du kit BVDV-Screening de LSI et doses pour sa reconstitution afin d'analyser.....	64
Tableau 22: Résultats pour la lyophilisation et la resolubilisation des composantes du kit BVDV-Screening de LSI lyophilisés.....	64
Tableau 23: Tests des séquences BVDV lyophilisées avec l'EPC et l'IPC lyophilisés et non lyophilisés.....	65
Tableau 24: Prix des kits, prix unitaires et autre coûts pour les tests ELISA et qPCR	68
Tableau 25: Les 8 différents coûts (en dollars) pour les deux types d'exploitation	69
Tableau 26: Coûts de la détection du BVDV par tests ELISA dans les 3 cas fictifs pour les 2 types d'exploitation	70
Tableau 27: Coûts de la détection du BVDV par tests qPCR dans les 3 cas fictifs pour les 2 types d'exploitation	70
Tableau 28: Coûts de la détection du BVDV pour les 3 cas fictifs pour les 2 types d'exploitation	71
Tableau 29: Récapitulatif pour les coûts des différentes méthodologies reprisent dans les 3 cas et les deux types d'exploitation, ainsi que la durée de l'évaluation du statut BVDV	72

Liste des abréviations

Ac : Anticorps
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
Ag : Antigènes
ARN : Acide RiboNucléique
Av. J-C : Avant Jésus Christ
BD : Border Disease
BVD : Bovine Viral Diarrhea (*la diarrhée virale bovine*)
BVDV : Bovine Viral Diarrhea Virus (*le virus de la diarrhée virale bovine*)
CIA : Central Intelligence Agency
Ct : Treshold cycle (*Cycle seuil*)
dNTP : Oligonucléotides
DO : Densité optique
DOc : Densité optique corrigée
DOm : Densité optique moyenne
EDTA : Ethylène-diamine-tétraacétate
ELISA : Enzyme Linked ImmunSorbent Assay
EPC : External Positive Control (*Contrôle positif externe*)
FAO : Food and Agriculture Organisation
IBR/IPV : Rinotrachéite Infectieuse Bovine/Vulvovaginite Pustuleuse Infectieuse
IFAD : International Fund for Agricultural Development
IPC : Internal Positive Control (*Contrôle positif interne*)
IPI : Infecté Permanent Immunotolérant
LSI : Laboratoire de Service International
MD : Mucosal Disease
NC : Negative Control (*Contrôle négatif*)
NCB : Negative Control Buffer (*Contrôle négatif du tampon*)
NCS : Negative Control Samples (*Contrôle négatif des échantillons*)
OIE : Organisation Internationale des Epizooties
PCR : Poly Chain Reaction (*Réaction de Polymérisation en chaîne*)
PI : Persistently Infected (IPI)
PRONINPA : Fundación para la promoción e investigación de productos andinos
qPCR : quantitative Poly Chain Reaction (*PCR en temps réel*)
RT : Reverse transcriptase (Transcriptase Inverse)
RT-PCR : Reverse transcriptase Poly Chain Reaction (*PCR transcription inverse*)
Taq : Taq Polymérase
UE : Union Européenne
VT : Virémie transitoire

Introduction

Introduction

La diarrhée virale bovine (BVD) est une pathologie animale répandue dans le monde entier. En réduisant la production et en induisant des diarrhées sévères suivies d'avortements, la BVD conduit directement et indirectement à des pertes évidentes pour les éleveurs.

Un problème majeur (et un cas unique en épidémiologie animal) est la survie des animaux Infectés Permanent Immunotolérants (IPI). Ces animaux ne reconnaissent pas le virus et le considère comme faisant parti de leur soi. Ils ne produisent pas d'anticorps et ne présentent que des symptômes subcliniques difficiles à observer. Ils peuvent donc porter le virus et le transmettre à tout le troupeau sans que l'éleveur ne s'en aperçoive. De plus un animal IPI donne automatiquement naissance à des veaux IPI.

La vaccination systématique est très coûteuse et des répétitions doivent être opérées régulièrement (tous les 1 à 2 ans). L'approche la plus adéquate de gestion du troupeau requiert donc d'éliminer la maladie en éradiquant les animaux IPI. C'est dans ce contexte que la détection du virus (et plus particulièrement des animaux IPI) est essentielle pour une production optimale et rentable.

Depuis 2009, le virus de la diarrhée virale bovine (le BVDV) a été observé dans 15 à 30% des troupeaux en Bolivie (WAHID Interface, 2009), cette prévalence est importante en comparaison avec beaucoup d'autres régions du monde.

Ce travail vise donc à mettre en place une méthode de détection du virus efficace, rapide et peu coûteuse en Bolivie. Dans un premier temps, les recherches bibliographiques menées porteront sur la pathogénécité du virus et des méthodes de détection et d'éradication existantes. La seconde partie du travail se déroulera en Bolivie au sein de la fondation de promotion des productions andines PROINPA. Le but est d'y implémenter une combinaison de méthodes immunologiques et (principalement) moléculaires afin de détecter le virus dans des troupeaux bovins de la région de Cochabamba et d'évaluer leur statut BVDV. Ensuite, ces analyses seront testées chez des lamas de la Paz, suspectés infectés, pouvant également être porteur du BVDV. Finalement, en fonction des résultats obtenus et des problèmes rencontrés, les méthodes connues et utilisées en Europe, seront revisitées et adaptées à la Bolivie.

Partie 1: Revue Bibliographique

Cette partie aura pour but de reprendre, en différents chapitres, les thèmes clés de mon mémoire. Chacun sera expliqué de manière plus ou moins détaillée à partir d'une recherche bibliographique d'études réalisées préalablement.

Chapitre 1: La Bolivie et son plan sanitaire appliqué aux troupeaux de ruminants

Chapitre 2: Le virus de la diarrhée virale bovine

Chapitre 3: La mise en évidence du BVDV

Chapitre 4: Lutte et contrôle du BVDV

Chapitre 1 : La Bolivie et son plan sanitaire appliqué aux troupeaux de ruminants

1. INTRODUCTION	2
1.1. GENERALITES	2
1.2. HISTOIRE ET INDEPENDANCE	4
1.3. SITUATION SOCIO-ECONOMIQUE	4
1.4. L'AGRICULTURE ET L'ELEVAGE	5
2. LE CONTROLE SANITAIRE	6
2.1. LES PROBLEMES SANITAIRES	6
2.2. STRUCTURES SANITAIRES MISES EN PLACE	7
3. LES PATHOLOGIES ANIMALES EN BOLIVIE	8

1. INTRODUCTION

1.1. GENERALITES

La Bolivie est un pays continental d'Amérique du Sud, situé au nord de l'Argentine et au sud-ouest du Brésil. Il partage ses frontières avec le Pérou, le Brésil, le Paraguay, l'Argentine et le Chili (voir Figure 2) (CIA, 2009).

La Paz est la capitale administrative, culturelle et le siège du gouvernement mais tous les Boliviens admettent que Sucre est la capitale constitutionnelle et le siège des activités commerciales et industrielles du pays^{1*}.

Au nord-ouest, la cordillère des Andes (traversant l'ouest du continent sud-américain) s'élève jusqu'à 6542m tandis qu'à l'est, le bassin amazonien descend à moins de 130m. C'est entre autre grâce à cette dénivellation importante que la Bolivie a une des biodiversités les plus impressionnantes du monde (Lonely Planet, 2007).

En altitude, les températures sont assez basses et le climat est froid et aride. Au centre, entre autre à Cochabamba, le temps est très agréable et cette région jouit d'une température moyenne de 25°C presque toute l'année. Tandis que vers le sud-est (dans le bassin amazonien) règne un climat tropical humide (FAO, 2005).

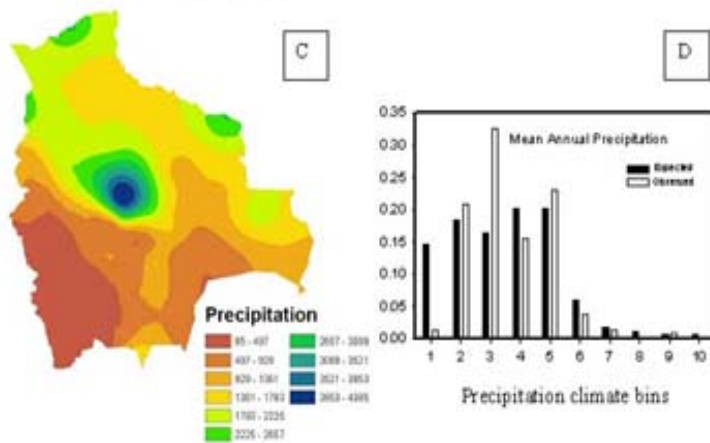


Figure 1 : Les précipitations en Bolivie. A gauche, précipitations annuelles dans les différentes régions de Bolivie. A droite précipitations moyennes mensuelles (bandes noires : attendues, bandes blanches : réelles)

Comme dans la plupart des pays tropicaux, les saisons sont directement liées au régime des précipitations. Dans tous les cas, le froid se ressent surtout lors de la saison sèche en juillet et août. La saison humide s'étend ensuite de novembre à mars (Routard, 2009).

* Les notes en bas de page sont reprises dans l'index bibliographique, à la fin du travail, point 2 : Sources électroniques non complètes.



Figure 2 : Carte géographique de la Bolivie (CIA,2009)

República de Bolivia (CIA, 2009)

Capitale : La Paz (siège du gouvernement)

Superficie : 1.098.581 km² (36 fois la Belgique)

Habitants : 9.775.246 (recensement juillet 2009)

Langue officielle : le castillano (espagnole)

Groupes ethnique : Quechua, Metisse, Amara

3 régions distinctes : l'Altiplano, la partie centrale et les plaines du Chaco

9 départements administratifs : Santa Cruz, Beni, Tarija, Potosí, La Paz, Chuquisaca, Pando, Cochabamba et Oruro

Monnaie : Boliviano (1 euros= 9,50 bolivianos (mars 2010))

1.2. HISTOIRE ET INDEPENDANCE

Avant l'indépendance, la Bolivie connu trois règnes différents. Tout d'abord, la civilisation Tiahuanaco, dont le centre cérémoniel se trouvait sur les rives du lac Titicaca, régna sur l'Altiplano péruvien du XVème siècle avant Jésus-Christ (av. J-C.) jusqu'au XVème siècle de notre ère. Ce règne fut ensuite remplacé par la civilisation Inca (1476-1534) (Lonely Planet, 2007). Le siège de leur pouvoir se situait à Cuzco (Pérou) mais leur empire s'étendait jusqu'aux frontières actuelles de la Bolivie, Argentine, Chili, Equateur et Colombie. C'est la conquête espagnole, en 1531, qui mit fin à la culture Inca en une année seulement, sous le commandement de Francisco Pizarro et de Diego de Almagro. Si ces deux personnages furent assassinés quelques années après, la colonisation et l'exploration du nouveau monde par les espagnols continuèrent. En 1538, la ville de Plata (la future Sucre) fut nommée la capitale espagnole de la région de Charcas. Les Indiens, ainsi que des milliers d'africains, furent réduits à l'esclavage et la mine de Potosi, en ce temps la plus productive au monde, fut surexploitée (Routard, 2009). Ce n'est qu'en mai 1809, qu'à Chuquisaca (l'ancienne Plata) qu'un premier mouvement d'indépendance se mit en place. Par la suite, les autres villes suivirent. Après l'indépendance du Venezuela, de la Colombie, de l'Equateur et finalement du Pérou, Sucre poussa l'Altiplano à déclarer son indépendance, et le 6 août 1825 la « República de Bolivia » vit le jour. Finalement, suite à des guerres, entre autre avec le Chili, la Bolivie perdit l'accès à la mer, ainsi que la moitié de son territoire initial (Routard, 2009).

1.3. SITUATION SOCIO-ECONOMIQUE

Lors de la civilisation Incas et ensuite, lors de l'arrivée des espagnols, un très grand nombre d'esclaves furent importés pour le travail dans les mines. Et par après, suite à la fermeture des mines et à des périodes de sécheresse intense, des milliers de personnes ont fui le pays. Mais malgré cette migration importante, la Bolivie est un des rares pays d'Amérique du Sud où la population indienne est la plus présente. C'est ainsi que 60% des boliviens sont des indiens (e.a Aymaras et Quechuas), 30% des *mestizos* (métisse, c'est-à-dire un mélange d'indiens et de blancs) et 10% sont des blancs. La population est sans cesse en croissance et plus particulièrement dans les 3 villes principales de Bolivie : La Paz, Cochabamba et Santa Cruz (Oostra *et al*, 2003). 95% des habitants sont catholiques; cette religion fut imposée lors du règne espagnol et ce n'est que depuis peu que l'Etat a été déclaré laïc.

En raison du relief, l'isolation de certains villages et communautés est importante et c'est ainsi qu'une multitude d'ethnies différentes (Quechua, Metisse, Aymara,...) se retrouvent en Bolivie, chacune ayant sa propre culture, danses et traditions vestimentaires et culinaires.

La Bolivie malgré une évolution constante depuis ces dernières années, reste un des pays les plus pauvres et les moins développés de l'Amérique Latine. L'économie bolivienne s'observe dans ces paysages et dans la vie de tous les jours: l'importance des mines et de l'agriculture, l'industrialisation quasi inexistante, les problèmes d'organisation et de coordination et la dépendance financière face à l'extérieur (Oostra *et al*, 2003). Depuis des siècles, ce pays est dépendant de l'export, et donc des fluctuations du marché externe, pour toutes une série de matières premières: l'argent et l'or du temps

du règne espagnol, le caoutchouc et le cacao au 19ème siècle, l'étain et la coca lors du 20ème siècle et de nos jours le soja, le pétrole et le gaz naturel, le bois et l'or. Ainsi, tout investissement au niveau des infrastructures se fait pour l'export et non pour l'intérieur du pays. De nos jours, même si l'économie est stable et en croissance, les problèmes de pauvreté ont encore du mal à être résolus (Oostra *et al*, 2003). La structure de production est encore très traditionnelle et la valeur ajoutée des produits exportés est très faible. Les opportunités de travail sont concentrées dans quelques secteurs où les conditions, les salaires et la sécurité sont très mauvais. Les secteurs les plus importants restent le travail dans les mines, l'agriculture, la filière de la coca, le pétrole et le gaz naturel et évidemment l'aide au développement (CIA, 2009).

Tableau 1 Principaux indicateurs économiques pour la Bolivie (CIA, 2009)

<ul style="list-style-type: none"> • PIB (2009) : 45,11 MD US\$ • PIB par habitant (2009) : 4 600 US\$ • Taux de croissance (2009) : 2,8 % • Taux de chômage (2009) : 8,5 % • Taux d'inflation (2009) : + 4,3 % • Part des principaux secteurs d'activités dans le PIB (2009) : <ul style="list-style-type: none"> - secteur agricole : 40 % - secteur industriel : 17 % - secteur des services : 43 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Principaux clients : Brésil 60.1%, USA 8.3%, Japon 4.1% (2008) • Principaux fournisseurs : Brésil 29.4%, Argentine 15.7%, USA 10.1%, Chili 9.1%, Pérou 6.9%, China 4.6% (2008)
--	---

Au 21ème siècle, les problèmes principaux au niveau de l'économie bolivienne reste un manque constant d'agrandissement et de croissance, des investissements et des épargnes internes trop faibles, un équilibre commercial négatif, une mauvaise intégration au niveau du commerce mondial, des mauvaises conditions de travail et d'importantes différences salariales et finalement une dette nationale qui reste encore très élevée.

1.4. L'AGRICULTURE ET L'ELEVAGE

Le paysage andin est fait de hautes plaines, de plateaux centraux et larges bassins dominés par des chaînes montagneuses. Malgré que la Bolivie rencontre plusieurs contraintes telles que le relief, l'altitude et le climat, elle est tout de même propice à l'agriculture et l'élevage. Ceci grâce à sa situation tropicale qui permet des températures positives à une altitude élevée, à ses massifs montagneux gardant l'air plus chaud et surtout grâce à ses diverses conditions topo climatiques (chaud/froid, plat/pentu, sec/humide) qui peuvent se combiner et influencer la flore et la faune en permettant une biodiversité surprenante.

Les terres propices à l'agriculture représentent 36828.10^3 ha soit environ 1/3 de la surface totale du pays. Selon la FAO, l'agriculture et l'élevage sont divisés en différents systèmes selon les trois régions topographiques retrouvées (Vera, 2006) :

Au niveau de l'Altiplano, les bovins sont surtout utilisés pour le travail et sont abattus vers 8 à 9 ans d'âge pour leur viande; plus rarement, dans les environs du lac Titicaca, ceux-ci sont utilisés pour le lait. Les ovins sont utilisés pour la viande et la laine et ont connu un grand succès lors de leur

importation par les espagnols. Et évidemment, les camélidés, faisant partie de la tradition et culture andine, se retrouvent majoritairement dans cette zone topographique. Les lamas, alpacas et vigognes sont utilisés pour leur viande, leur laine et fibres, le cuir et leurs excréments comme engrais et énergie.

Deux systèmes sont présents dans cette région: le système pastoral et le système agropastoral.

Le système pastoral utilise principalement les moutons et les camélidés et se retrouve surtout dans les régions où l'agriculture et la pluviométrie sont moindres.

Le système agropastoral a lieu dans des zones plus propices à l'agriculture où les cultures andines typiques (quinoa, canihua, pommes de terre, maïs, blé,...) se combinent à l'orge et parfois à de la luzerne irriguée. Des ranchs de bovins et de moutons se retrouvent dans ces régions (Vera, 2006).

Dans les Yungas et autres vallées, des élevages d'Holstein sont présents, et particulièrement aux alentours de Cochabamba. Les exploitations sont généralement composées d'une vingtaine de tête et sont traditionnelles, les fermes plus importantes utilisant les techniques modernes d'élevage sont en minorités. L'alimentation du bétail se fait principalement par des silos de maïs et de luzerne et par le pâturage. Les méthodes de croisement et d'augmentation du potentiel génétique ont malheureusement évolué trop vite quant aux techniques d'alimentation et d'aménagement des pâtures. Les systèmes d'élevage sont intensifs à semi-intensifs et les cultures généralement bisannuelles (Vera, 2006).

Pour finir, dans la partie tropicale à l'est du pays, l'élevage composé essentiellement de zébu et de croisés avec des races européennes est de type extensif avec des ranchs moyennement à fortement étendus. L'élevage de rongeurs y est aussi répandu pour l'utilisation de leur viande et de leur peau (Vera, 2006). Dans ces 3 régions, les élevages de volaille sont généralement de type urbain.

2. LE CONTROLE SANITAIRE

2.1 LES PROBLEMES SANITAIRES

La Bolivie est un pays où l'économie dépend principalement de l'élevage et de l'agriculture. Depuis le milieu des années '80, des programmes de stabilisation macroéconomique et de réformes structurelles ont été mis en place afin de diminuer la pauvreté et de développer l'économie.

Des mesures ont également été prises pour le secteur rural, mais ne semblent pas prendre formes.

Les élevages de bovins et d'ovins, malgré une nourriture plus ou moins abondante, donnent des rendements carcasse, des productions laitières et des performances de reproduction beaucoup moins rentables que celles connues dans nos pays. Ceci est principalement dû au manque de formation, d'assistance technique et d'infrastructure, de profit des nouvelles technologies et d'organisations d'éleveurs (surtout au niveau de l'altiplano) (FAO, 2005).

Et même si les camélidés des Andes sont des animaux résistants et bien adaptés, le manque d'alimentation et de soins vétérinaires mène également à des problèmes de mortalité, de morbidité et de faibles productions. La connaissance et l'expérience des éleveurs ne suffisent alors pas pour répondre à la demande du marché actuel tant au niveau de la qualité que de la quantité (IFAD, 2001).

C'est donc le manque d'aides aux productions animales (service vétérinaire, extension du bétail, organisation coopérative des producteurs,...) qui mène à des niveaux faibles de productivité, un degré élevé de consanguinité (surtout pour les camélidés) et peu de spécialisation (IFAD, 2001) .

2.2 STRUCTURES SANITAIRES MISES EN PLACE

Les services vétérinaires sont assurés tant par le service public que par le privé.

Au niveau de l'Etat, la SENASAG (Système National de Santé agricole et d'innocuité alimentaire) a été mis en place en 2000 et a fait beaucoup de chemin depuis.

La SENASAG a pour mission d'améliorer et de protéger les conditions sanitaires du patrimoine productif agricole et forestier et de garantir une innocuité alimentaire via la santé animale.

« De nos jours, SENASAG est un service d'excellence, de confiance et de crédibilité au niveau national et international. Ce service a fait en sorte que les secteurs visés obtiennent un bon statut sanitaire, ainsi que l'implémentation d'un système de qualité et une bonne efficacité. Il a obtenu un grade d'excellence en certification sanitaire et dispose à présent de moyens techniques, financiers et d'infrastructure pour atteindre ces objectifs. », peut-on lire sur leur site internet (SENASAG, 2010).

Au niveau du secteur animal, leur but est d'améliorer la situation zoonositaire du pays en:

- renforçant le système de soins vétérinaires
- intensifiant les systèmes d'épidémiosurveillance
- améliorant les laboratoires de diagnostic et d'analyse zoonositaire
- apportant un appui aux campagnes contre la fièvre aphteuse et la salmonellose aviaire
- prêtant plus d'attention aux urgences zoonositaires

La SENASAG n'a pas ses propres laboratoires d'analyse et accrédite donc d'autres laboratoires pour analyser ses échantillons. Les laboratoires de PROINPA sont accrédités pour la section santé végétale et font les démarches pour une accréditation au niveau du diagnostic moléculaire en pathologies animales. Ces laboratoires sont de types privés et se retrouvent à La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, ... (SENASAG, 2010). La SENASAG travaille également avec deux laboratoires étatiques: LIDIVECO (à Cochabamba) et LIDIVET (à Santa Cruz). Mais comme tout ce qui appartient à l'état est très précaire, ces laboratoires ne sont pas très efficaces.

Finalement, l'INLASA est l'Institut National de la Santé dont le siège se trouve à La Paz et qui comporte 83 laboratoires en Bolivie (Sopocachi, 2006). L'institut travaille en collaboration avec le ministère de la santé et est surtout concentré sur tout ce qui est contamination bactérienne des aliments, de l'eau,...

En Bolivie, malgré une investigation certaine, les structures mises en place sont insuffisantes au niveau zoonositaire et généralement trop ciblées sur quelques pathologies.

De temps en temps, des estimations de la prévalence d'une certaine pathologie se font chez un certain nombre d'éleveurs (hélas, ce sont toujours les mêmes éleveurs qui bénéficient de cette aide). Les autres exploitations qui veulent tester leurs animaux, sont par contre obligées de payer elles-mêmes

les analyses. Les laboratoires d'analyses n'ayant pas beaucoup de subsides et utilisant parfois des méthodes encore peu efficaces et très coûteuses, sont obligés de facturer leurs analyses à des prix trop élevés pour les éleveurs. La mise en place de systèmes de détection plus performants dans les laboratoires et une prise de conscience des pertes que peuvent engendrer certaines pathologies animales, sont également des clés pour améliorer la santé animale en Bolivie.

3. LES PATHOLOGIES ANIMALES EN BOLIVIE

En raison du manque d'investissement dans les structures sanitaires, la base de données WAHID Interface, ne renseigne que peu de pathologies pour la Bolivie (WAHID Interface, 2009).

En 2009, uniquement 5 maladies étaient signalées comme « infection confirmée »: la rage, la Diarrhée Virale Bovine (BVD), la Loque européenne des abeilles mellifères, la Rinotrachéite Infectieuse Bovine/Vulvovaginite Pustuleuse Infectieuse (IBR/IPV) et le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc. Beaucoup de maladies sont « suspectées » (Brucellose, Cholera aviaire, Paratuberculose,...) et certaines « limitées à une ou plusieurs zones » (Peste porcine classique, Stomatite vésiculeuse,...). Au niveau des espèces sauvages, les données sont inexistantes (WAHID Interface, 2009).

Concernant la BVD, son apparition en Bolivie est récente. En effet, en 2008, l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) avait considéré la Bolivie comme « suspecte » concernant la présence de la Diarrhée Virale Bovine (BVD), en 2009 son statut est passé de « suspect » à « infecté » (WAHID Interface, 2008-2009).

Dans les pays voisins quelques études ont été menées sur cette maladie, tandis qu'en Bolivie aucune publication sur le BVDV ne se retrouve dans la littérature. En Argentine, par exemple, le pourcentage de troupeaux positifs en BVDV était évalué à 70% en 2009 (Juliá *et al*, 2009; Odeon *et al*, 2009). Au Chili, la séroprévalence du virus, au niveau des tanks à lait de troupeaux laitiers, était évaluée à 96% (Felmer, 2009). Chez les bovins viandeux, le virus était présent dans 69,2% des troupeaux Chilien, en 1997 (Celedon, 1997). Finalement en Uruguay, il semblerait que 69 % des troupeaux ont déjà été exposés au BVDV mais que le risque d'exposition est proche de 100% (Guarino *et al*, 2008).

Chapitre 2 :

Le virus de la diarrhée virale bovine

1.	<u>CONTEXTE HISTORIQUE ET SITUATION ACTUELLE</u>	9
2.	<u>DESCRIPTION DU VIRUS BVD</u>	9
3.	<u>PATHOGENIE ET EPIDEMIOLOGIE</u>	11
3.1	GENERALITES	11
3.2	LES INFECTIONS INTRA-UTERINES INDUITES PAR LE BVDV	12
3.3	LA MALADIE DES MUQUEUSES (MD) SUITE A UNE INFECTION AU BVDV	13
4.	<u>IMPACTS ECONOMIQUE ET FINANCIER INDUITS PAR UNE INFECTION AU BVDV</u>	14
4.1	CALCUL DU RISQUE D'INSERTION D'UN ANIMAL INFECTE DANS UNE POPULATION	14
4.2	QUANTIFICATION DES PERTES ECONOMIQUES	15

1. CONTEXTE HISTORIQUE ET SITUATION ACTUELLE

Le BVDV est observé pour la première fois en 1946 (Olafson *et al*, 1946). A cette époque, de plus en plus de troupeaux laitiers de l'Etat de New York présentent des gastroentérites suivies de diarrhées sévères. Certains de ces animaux développent des ulcères au niveau des muqueuses nasales et buccales, suivis par des cas d'avortement. Pourtant aucune bactérie, pouvant provoquer les mêmes symptômes dans des troupeaux sains, n'est trouvée au niveau du sang et des tissus².

Finalement, suite à des études de transmission et d'immunité, la recherche conclut qu'il s'agit d'une peste virale, la maladie est appelée la diarrhée virale bovine ou la Bovine Viral Diarrhea (BVD) (Olafson *et al*, 1946).

Au même moment, une maladie nommée la maladie des muqueuses ou la Mucosal disease (MD) est décrite par Ramsey et Chivers (1953). Elle est alors considérée comme distincte de la BVD malgré les symptômes similaires qu'elle engendre. Ce n'est qu'en 1961, que des études démontreront qu'en réalité la MD et la BVD sont induites par le même virus, le BVDV (Gillespie *et al*, 1961). Par la suite, les chercheurs parviennent à décrire le virus, à l'isoler et se rendent compte de sa diversité génétique (Dubovi, 1992).

De nos jours, le BVDV a été mis en évidence au sein de très nombreuses espèces (telles que le mouton (Ward, 1971; Gardiner *et al*, 1971; Nettleton *et al*, 1980), la chèvre (Huck, 1973), le porc (Stewart *et al*, 1971; Terpstra *et al*, 1988; Paton *et al*, 1992), le daim (Hofmann *et al*, 1995), les alpagas et lamas (Fowler, 1998; Tibary *et al*, 1997) et présente une dispersion géographique mondiale (Winslow, 2009). Les animaux infectés présentent des performances moindres de production et surtout de reproduction, ce qui peut entraîner des conséquences économiques catastrophiques. La lutte contre ce virus est donc essentielle. C'est pourquoi de plus en plus de plans d'éradication sont mis en place, essentiellement dans le nord de l'Europe et des Etats-Unis. Par contre, dans les pays en voie de développement ou émergents, la prise de conscience du phénomène et la mise en place de plan de lutte efficace sont beaucoup plus difficiles par manque de communication et d'information concernant les précautions à prendre, les régions et troupeaux contaminés, les moyens de détection existants, etc ... (Ridpath, 2010).

2. DESCRIPTION DU VIRUS BVD

Le BVDV est un virus à Acide Ribonucléique (ARN) positif (virus ARN +), qui appartient à la famille des Flaviviridae (virus de l'hépatite C, virus de la fièvre jaune et virus de la dengue) et au genre Pestivirus (peste porcine classique et maladie des frontières) (Collet *et al*, 1988).

Le classement des différents BVDV existants se fait selon leur génotype et leur biotype.

Le BVDV de type I (a, b) et le BVDV de type II sont les deux génotypes majeurs (Ridpath *et al*, 1998). Ils se distinguent par leur assemblage génomique et leur antigène. Leur virulence est considérée comme semblable même si le type II engendre souvent des affections plus graves, comme des hémorragies (Thiry, 2007).

Le biotype correspond au caractère cytopathogène ou non-cytopathogène du virus. Lorsqu'il est cytopathogène (souche mutante), il mène à la destruction des cellules et peut être responsable de la maladie des muqueuses (Howard *et al*, 1987). S'il est non-cytopathogène, le virus ne détruit pas les cellules et peut contribuer ainsi à la naissance d'animaux infectés permanent immunocompétents (IPI).

Le génome de tout virus est protégé par une enveloppe appelée capsid et le BVDV dispose, comme certain autres virus, d'une couche lipidique supplémentaire présentant des spicules (excroissances donnant un aspect rugueux à la surface du virus) (Dubovi, 1992).

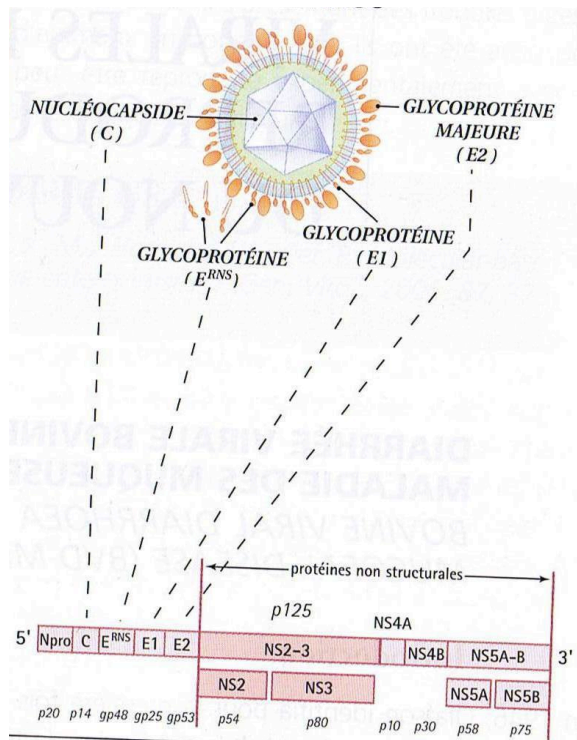


Figure 3 : Représentation du génome des virus du genre Pestivirus (Thiry, 2007)

Les **protéines structurales** comprennent (Thiry, 2007):

- une nucléocapside C (p40) dont la fonction est d'organiser l'ARN génomique dans l'enveloppe du virion
- trois glycoprotéines Erns, E1 et E2 (gp48, gp25, gp53) lesquelles sont associées à l'enveloppe lipidique. C'est la protéine E2 qui contient les sites majeurs de reconnaissance pour la production d'anticorps neutralisants contre le BVDV chez les animaux infectés ou vaccinés.

Les six **protéines non structurales** sont la Npro (p20), NS23(p125) clivée en NS2 et NS3 (p80) dans le cas des souches cytopathogènes, NS4A (p10), NS4B (p32) et NS5A (p58) et NS5B (p75).

Les virus ARN+ ont la particularité d'avoir un ARN génomique directement messenger (contrairement au virus avec un brin d'ARN négatif) (Conzelmann, 1998). C'est à dire qu'une fois que l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule, il est transcrit par les ribosomes cellulaires en protéines de structure et en la protéine ARN-polymérase-ARN-dépendante (nécessaire à la réplication de l'ARN) (Ahlquist *et al*, 2003). Cette polymérase (appelée réplisase) permet la synthèse d'un brin d'ARN négatif (ARN-) à partir duquel plusieurs ARN+ sont générés. Ces derniers correspondent aux ARN génomiques viraux, ils pourront à leur tour participer à la synthèse protéique et permettre ainsi la multiplication du virus dans l'organisme hôte (figure 4, verso page 9).

3. PATHOGENIE ET EPIDEMIOLOGIE

3.1 GENERALITES

Les conséquences d'une infection par le BVDV varient en fonction du génotype et du biotype, de l'âge ou du stade physiologique et immunologique de l'hôte et de la présence d'autres agents pathogènes (Brownlie *et al*, 1987).

Si les sous-génotypes Ia et Ib et le génotype II apparaissent à des fréquences plus ou moins égales (Bolin *et al*, 1998), le type II conduit à des affections plus importantes (hémorragies). Par contre, en ce qui concerne le biotype, dans 99% des cas le virus est non-cytopathogène (souche sauvage, non mutante) (Dairy producers, 2009).

Le stade physiologique le plus problématique est la gestation, car le virus peut être transmis verticalement et est donc capable de traverser le placenta et d'induire des infections intra-utérine chez les animaux gestants. Ceci peut engendrer des avortements, des problèmes de reproduction, ou pire, mener à la naissance d'animaux IPI. Cette problématique sera abordée au point 3.2.

La transmission horizontale du BVDV se fait via les sécrétions nasales et orales, les fèces et l'urine et éventuellement par des morsures d'insectes, des semences infectées ou du matériel contaminé. L'entrée primaire du BVDV se trouve au niveau des voies buccales et nasales (Thiry, 2007).

Une fois dans l'organisme hôte, le virus enclenche sa réplication au niveau des cellules épithéliales pour ensuite se répandre via le système circulatoire. Il peut ainsi atteindre les tissus et engendrer une infection en se trouvant soit sous forme libre dans le sérum soit sous forme de leucocytes infectés (Lindberg, 2002). L'incubation dure 5 à 7 jours et l'animal atteint présente des signes cliniques en deux phases. Dans un premier temps, il sera en hyperthermie avec chute de la production. Ensuite, des diarrhées et un jetage nasal important sont observés, accompagnés d'une éventuelle stomatite ulcéreuse et, dans certains cas, d'hémorragies (génotype II) (Thiry, 2007). Les animaux sont immunodéprimés et plus vulnérables à une seconde infection (Ridpath, 2010).

La détection et l'isolation du virus peuvent se faire dans les 3 à 10 jours qui suivent l'infection à partir d'échantillons de sérum et/ou leucocytes. Les animaux infectés à virémie transitoire (VT) détectés doivent alors être séparés des autres afin d'éviter toute transmission. Après environ trois semaines, les animaux ont acquis une immunité (séropositif) et ne sont plus considérés comme contagieux (voir figure 7, page 16) (Dairy producers, 2009).

3.2 LES INFECTIONS INTRA-UTERINES INDUITES PAR LE BVDV

Si le virus peut traverser le placenta à tout moment, son impact sera différent en fonction du stade de gestation de l'animal (Backer, 1995). La figure 5 (verso page 11) reprend les différents effets qu'une infection au BVDV d'un animal gestant peut engendrer en fonction du stade de gestation.

Infection intra-utérine dans le premier mois de gestation:

Une fois l'embryon séparé de la membrane pellucide (jour 10), il devient vulnérable et l'est d'autant plus lorsque l'implantation a lieu (jours 20). A ce stade, une infection au BVDV conduit à la mort embryonnaire et à la résorption du fœtus (McGowan *et al*, 1993; Goyal *et al*, 2005).

Infection intra-utérine lors du premier trimestre:

A la fin de cette période (jour 100), le fœtus établit une immunocompétence, c'est à ce moment que la reconnaissance des antigènes du soi a lieu. Par ailleurs, si le fœtus est infecté (via sa mère), le virus est reconnu comme appartenant au soi et peut se répliquer et survivre (McClurkin *et al*, 1984). Le fœtus peut alors survivre mais ses performances seront moindres et la morbidité ou mortalité est alors plus probable. Quoiqu'il en soit, les animaux qui survivent sont considérés comme infectés à vie, ils sont appelés "PI animals" (Persistently Infected animals) (McClurkin *et al*, 1984) ou animaux infectés permanents immunotolérants (IPI). Ceux-ci sont les plus dangereux, car ils peuvent sembler en très bonne santé sans présenter les symptômes du BVDV mais transmettre le virus à d'autres animaux présents dans le troupeau (Thiry, 2007). De plus, les mères IPI donnent automatiquement naissance à des veaux IPI (figure 6, verso page 11). L'espérance de vie de ces animaux est d'environ trois ans (à un moment ou un autre la maladie des muqueuses apparaît et l'issue est fatale) ce qui leur laisse le temps de transmettre le virus à tout le troupeau et d'eux-mêmes produire des descendances IPI.

Infection intra-utérine en fin de 1er trimestre, au deuxième et au début du troisième trimestre

Une infection lors de cette période peut alors engendrer des anomalies congénitales de différentes sortes telles que la cataracte, la dégénération et l'hypoplasie cérébrale, des malformations du squelette, un retard de croissance général,... (Goyal *et al*, 2005).

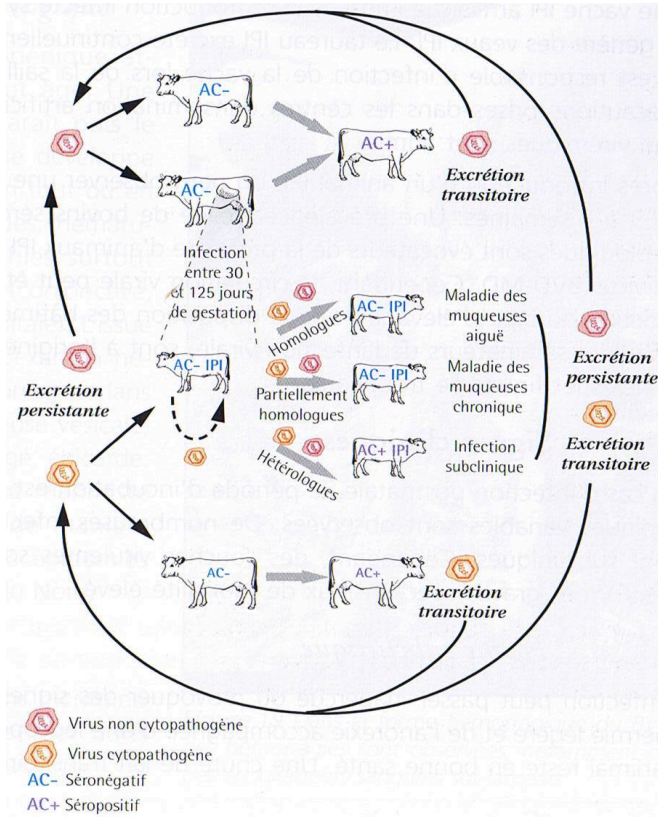
Infection intra-utérine lors du second trimestre

Le fœtus est capable d'acquérir une réponse immunitaire contre une infection au BVDV, mais le virus, dans certains cas, induira un avortement ou des anomalies congénitales. Une infection à un stade de gestation avancé conduit à des naissances d'animaux considérés comme normaux cliniquement, ceux-ci présentent des anticorps de BVDV même avant d'avoir reçu le colostrum (Goyal *et al*, 2005).

3.3 LA MALADIE DES MUQUEUSES (MD) SUITE A UNE INFECTION AU BVDV

Un animal IPI peut être surinfecté par une souche cytopathogène plus ou moins proche de la souche non-cytopathogène qui l'a infecté préalablement. Si ces deux souches sont proches d'un point de vue génétique, l'animal présentera une maladie des muqueuses chronique voir aiguë (Brownlie *et al*, 1984; Thiry, 2007).

La Figure 7 reprend les différents cas possibles pouvant se présenter dans le cas d'une infection par le BVDV.



La Mucosal Disease (MD) est un événement fortement aléatoire car premièrement l'animal doit déjà être infecté par le BVDV (animal IPI) et deuxièmement une surinfection par un BVDV cytopathogène à antigènes similaires doit avoir lieu.

Figure 7 : Epidémiologie de la diarrhée virale bovine et de la maladie des muqueuses (Thiry, 2007)

Cette maladie est donc une conséquence d'une infection au BVDV, les symptômes sont (Duffell *et al*, 1985) :

- une perte de poids soudaine et une inappétence entre 6 et 24 mois d'âge
- une salivation importante
- des diarrhées profuses à forte odeur
- l'infection d'un ou 2 animaux au même moment
- une érosion et un rougissement des gencives, de la langue et du museau

Malgré que la maladie des muqueuses soit plutôt rare les dégâts sont assez importants car dans 90% des cas une mort s'ensuit dans les 7 jours (Duffell *et al*, 1985).

4. IMPACTS ECONOMIQUE ET FINANCIER INDUITS PAR UNE INFECTION AU BVDV

Les effets néfastes qu'une infection au BVDV provoque sur la santé des animaux engendrent des pertes économiques évidentes. La production et reproduction des animaux infectés sont mises à mal et bien souvent ces animaux doivent être éradiqués pour éviter la contamination du troupeau entier (Houe, 1999). L'IPI a un rôle central dans l'épidémiologie du BVDV et son éradication s'avère donc indispensable. Voilà pourquoi de plus en plus de régions, nations et unions s'intéressent à une estimation de l'impact économique qu'à l'apparition du virus dans un troupeau (Houe *et al*, 2006).

Pour ce, il faut tout d'abord évaluer le risque d'insertion d'un animal IPI dans le troupeau. Ce qui permet d'avoir une idée du degré de prévalence du BVDV dans un troupeau ou une région.

Ensuite, le choix d'une méthode de quantification des coûts doit se faire, suivi de la quantification elle-même. Etant donné le nombre important de méthodologies présentes dans la littérature, il sera souvent utile de comparer des résultats obtenus à partir de différentes méthodes (Houe, 1999).

Une fois les pertes estimées, des programmes de contrôle et de prévention sont mis en place. Ces contrôles sont fonction de plusieurs critères (état de la situation, contrôles nationaux ou individuels, région,...) et sont discutés au chapitre 4 (Lutte et contrôle) de cette première partie.

4.1 CALCUL DU RISQUE D'INSERTION D'UN ANIMAL INFECTE DANS UNE POPULATION

Si de nombreuses études démontrent que la probabilité qu'un animal soit infecté dans un troupeau est d'approximativement 0.1-0.2%, le risque d'insérer un animal IPI dans un troupeau est bien plus élevé dans certaines régions (Winslow, 2009). Il est fonction du pourcentage d'animaux IPI présents dans la population source et du nombre d'animaux insérés dans le troupeau. Pour un pourcentage donné d'animaux IPI dans la population source, au plus le nombre d'animaux introduit augmente, au plus le risque augmente. Le tableau 2 résume les probabilités de risque d'insertion d'un animal contaminé dans un troupeau (Houe, 1999).

Tableau 2: Probabilité de risque d'insertion d'un animal PI

Number of Calves Introduced	PI Prevalence Level in Source Calves						
	0.10%	0.15%	0.20%	0.25%	0.30%	0.35%	0.40%
50	4.9%	7.2%	9.5%	11.8%	13.9%	16.1%	18.2%
100	9.5%	13.9%	18.1%	22.1%	26.0%	29.6%	33.0%
250	22.1%	31.3%	39.4%	46.5%	52.8%	58.4%	63.3%
500	39.4%	52.8%	63.2%	71.4%	77.7%	82.7%	86.5%
1,000	63.2%	77.7%	86.5%	91.8%	95.0%	97.0%	98.2%
2,500	91.8%	97.7%	99.3%	99.8%	99.9%	100.0%	100.0%
5,000	99.3%	99.9%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
10,000	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Hans Houe (Houe, 1999) propose également une méthode pour calculer cette probabilité de retrouver l'infection dans un troupeau (annuellement) à partir de la prépondérance d'animaux infectés dans les troupeaux sources. Ceci uniquement lorsque la vaccination n'est pas d'utilisation et que ce risque est

considéré comme constant d'année en année. Ainsi, Houe (1999) observe pour des troupeaux danois une probabilité de 35% et pour ceux ne contenant aucun animal IPI une probabilité de 20-25%. Dans les Alpes Suisses, il remarqua que la probabilité d'avoir une infection (par an) sur les pâtures avec des animaux IPI se situe entre 33 et 100% en comparaison avec des pâtures sans animaux IPI où elle se situe en 6 et 22%. La connaissance de telles différences permet l'estimation des pertes tant à l'échelle d'un troupeau qu'au niveau national.

4.2 QUANTIFICATION DES PERTES ECONOMIQUES

Une fois que le risque d'insérer des animaux infectés dans le troupeau est estimé, la quantification des pertes économiques que ces animaux engendrent peut être calculée.

Les conséquences économiques directes sont les pertes causées par la diminution des performances de production et de reproduction des animaux et les dépenses effectuées pour des traitements de prévention et/ou de guérison du troupeau ou de l'animal. Il est évident que cet impact est directement proportionnel avec le degré d'intensité de la BVD présente dans le troupeau (Houe, 2003).

Les coûts indirects prennent, par exemple, en compte le risque plus important qu'a l'animal contaminé, et donc plus sensible, d'être infecté par d'autres pathogènes. En réalité, comme ces coûts sont presque toujours ignorés, il s'agit plus d'une estimation que d'une quantification exacte.

La méthodologie de quantification est choisie en fonction du niveau de l'estimation (national ou individuel), du type d'estimation (méthodes de comparaison ou de simulation), de l'importance des dégâts induits fonction du type de virus, du nombre d'animaux infectés, etc. (Houe, 1999 ; Gunn *et al*, 2004). Enormément de méthodes se retrouvent dans la littérature, aucune n'est considérée comme générale étant donné les nombreux facteurs de variation d'une région à une autre, voir d'un troupeau à un autre.

Dans son travail, Houe (1999) détaille également des méthodes d'estimation des pertes économiques au niveau d'un troupeau. Il estime ainsi à partir de 14 troupeaux danois infectés, une perte moyenne de 77\$ (58 €) /vache/an avec une variation allant de 23 à 161\$ (17-122 €). Gunn *et al* (2004) obtient une valeur semblable pour des troupeaux viandeux d'Écosse, avec une perte estimée à 58€/vaches/an. L'INRA remarque que, pour l'Union Européenne (UE), les estimations publiées varient de 13 à 160 €/vache/an dans un troupeau (pouvant aller jusqu'à 410 €). Considérant cette valeur trop variée et voulant donner une estimation plus précise, l'INRA réalise une étude afin de quantifier les coûts qu'engendrent des effets "moyens" de la maladie (Fourichon, 2004). Les dépenses et revenus (coût des avortements, rendement laitier, dépenses pour le traitement des veaux,...) obtenus pour un animal non infecté, un animal infecté "moyennement" et un animal gravement infecté sont comparés. Cette étude conclut que pour une exploitation, produisant leurs quotas et avec une infection au BVDV en cours, le coût de la maladie s'élève en moyenne à 60-100 €/vache/an (Fourichon, 2004).

Aux Etats-Unis, une vache infectée par le BVDV coûterait 61\$ (46 €) /an à l'éleveur⁵. C'est également le résultat qu'obtient une étude dans l'Etat d'Oklahoma (USA), où l'estimation se situe entre 50-70\$ (38-53 €)/vache/an⁶.

Chapitre 3:

Mise en évidence du BVDV

1. INTRODUCTION	16
2. L'ISOLATION D'UN VIRUS	16
3. LE TEST ELISA	16
3.1 INTRODUCTION	16
3.2 ELISA BLOQUANT LES ANTICORPS (BLOCKING ELISA)	17
3.3 ELISA CAPTEUR D'ANTIGENES (BVD ANTIGEN CAPTURE)	18
3.4 L'ELISA ET LE BVDV EN PRATIQUE	18
4. LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE	19
4.1 INTRODUCTION	19
4.2 LA REVERSE TRANSCRIPTASE-PCR	20
4.3 LA PCR EN TEMPS REEL OU PCR QUANTITATIVE	20
4.4 DEFINITIONS CLES POUR L'INTERPRETATION DES RESULTATS	22
4.5 LA PCR ET LE BVDV EN PRATIQUE	25
5. COMPARAISON DES 3 METHODES	26

1. INTRODUCTION

Le BVDV ayant des effets néfastes sur la santé des animaux, conduit inévitablement à des pertes économiques plus ou moins importantes au sein d'une exploitation, d'une région agricole. C'est pourquoi la mise en évidence du virus est essentielle car elle permet de détecter la présence d'animaux infectés ou en virémie transitoire mais elle est surtout importante pour la détection des animaux IPI. Ces derniers sont les plus dangereux et devront être éliminés ou éloignés du troupeau le plus rapidement possible.

En virologie, la présence d'un virus ou d'une infection par un virus peut être détectée de manières multiples en se basant sur différents critères. Les méthodes les plus utilisées pour la détection du BVDV sont **l'isolation du virus, le test ELISA ou la détection d'ADN /ARN viral** (OIE, 2008).

2. L'ISOLATION D'UN VIRUS

La mise en culture monocouches de cellules de bovins (rein, poumon, testicule, cornet naseaux,..) permet la multiplication du virus lorsqu'il est présent. Ceci engendre généralement un effet cytopathogène permettant la détection d'un virus spécifique (Bolin *et al*, 1994).

Cette méthode est moins utilisée car la mise en culture d'un virus est exigeante. Les laboratoires doivent être bien équipés et disposer de temps. De plus, les consignes de sécurité sont très strictes, car les manipulateurs et la collectivité doivent être protégés.

Considérant que le BVDV n'étant pas répertorié comme pathogène pour l'homme, cette méthode est utilisée pour mettre en évidence ce virus malgré sa mise en œuvre fastidieuse.

3. LE TEST ELISA

3.1 INTRODUCTION

L'Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) utilise, comme son nom l'indique, une enzyme conjuguée à un anticorps (ou antigène). Cette enzyme réagit avec un substrat incolore pour générer un produit de réaction coloré (Kindt *et al*, 2006). L'ELISA a recours à la réaction immunologique antigène-anticorps et présente, à ce titre, de nombreuses variantes. Toutes assurent la détection de la présence ou de l'absence d'anticorps (Ac) ou d'antigènes (Ag) (indiquées par une coloration) et la plupart, permettent la quantification (courbe de référence établie à l'aide de standards de concentration connue) (Kindt *et al*, 2006).

Chaque technique ELISA peut être directe (marquage du complexe Ac-Ag) ou indirecte (pas de marquage directe du complexe Ac-Ag). Différentes adaptations/évolutions de la technique ELISA existent mais nous ne décrivons ici que les deux approches utilisées dans ce travail, à savoir l'ELISA bloquante (Blocking ELISA) et l'ELISA de type sandwich, présentées aux points 3.2 et 3.3.

En rappel et pour une meilleure compréhension des points suivants, un aperçu de la structure du génome du BVDV est représenté à la figure 8.

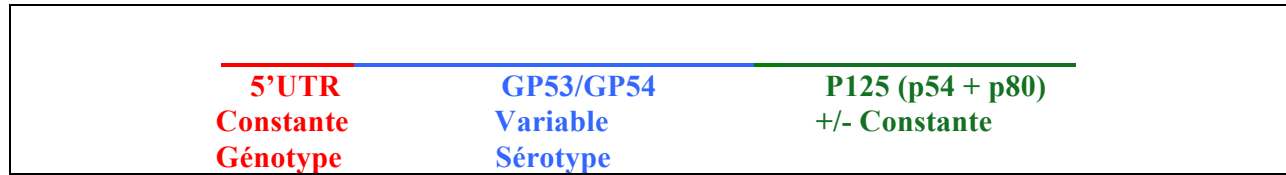


Figure 8: Représentation des zones les plus importantes du génome du BVDV pour la détection

3.2 ELISA BLOQUANT LES ANTICORPS (BLOCKING ELISA)

La méthode ELISA mise en place pour détecter la présence d'anticorps dirigé contre le BVDV (en particulier la protéine non-structurale p80) chez un individu, est une ELISA de compétition de type directe (principe présenté à la figure 9).

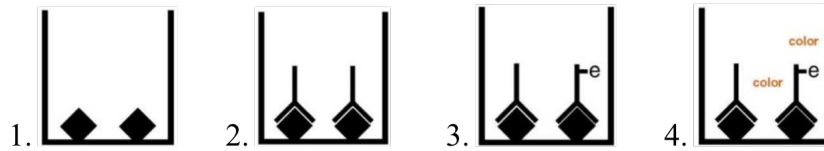


Figure 9: ELISA de compétition de type directe (1. protéines p80 fixées dans le puits (Ag), 2. complexe "Ag-Ac contre le BVDV à doser", 3. complexe "Ag-Ac de compétition marqué", 4. Coloration de la solution)

Dans un premier temps les antigènes (protéine p80), en quantité limitée, fixés dans le puits sont mis en présence de notre échantillon. Les éventuels anticorps (présents suite à une infection antérieure par le BVDV) réagissent avec ces antigènes. Par la suite, un lavage élimine toutes autres molécules présentes dans notre échantillon, il ne reste que d'éventuels complexes « Ag-Ac » fixés dans le fond du puits. Des anticorps monoclonaux de compétition (sachant également se fixer aux antigènes) marqués sont ensuite ajoutés en excès et se fixent aux antigènes libres dans le puits (Kindt *et al*, 2006). Une heure après, un deuxième lavage est effectué et le substrat est alors ajouté afin de mettre en évidence les anticorps de compétition. Au plus la coloration est intense, au plus il y a d'anticorps de compétition, au moins il y a d'anticorps à doser. La présence d'une coloration signifie donc l'absence (ou presque) des anticorps contre le BVDV (Kindt *et al*, 2006).

La protéine p80 est hautement immunogène et présente une conservation antigénique chez les différentes souches de BVDV. Ces anticorps peuvent être mis en évidence soit dans le tank à lait, soit à partir d'échantillons de sérum ou de plasma (Beaudeau, 2001).

3.3 ELISA CAPTEUR D'ANTIGENES (BVD ANTIGEN CAPTURE)

Cet ELISA est de type sandwich directe et est utilisée pour la détection d'antigènes dans des échantillons de sang. Cette méthode utilise des anticorps polyclonaux (fixés) sur lesquels viennent se fixer les antigènes éventuellement présents dans notre échantillon. Après un premier lavage, des anticorps anti-BVDV marqués par une enzyme sont ajoutés en excès (Marzocca *et al*, 2007). Un complexe "Ac-Ag-Ac marqué" se forme, l'antigène se trouve donc "en sandwich" entre les deux anticorps. Un dernier lavage permet ensuite d'éliminer les anticorps marqués restants (Kindt *et al*, 2006). Le complexe est alors quantifié par réaction enzymatique et le dosage des antigènes peut être effectué. Les anticorps polyclonaux utilisés sont dirigés contre la protéine E2 (glycoprotéine GP53 de l'enveloppe du virus) qui comprend les sites majeurs de reconnaissances du BVDV (voir Partie 1, Point 2.2) (OIE, 2008).



Figure 10: ELISA en sandwich type directe (Lafont, 2009)

3.4 L'ELISA ET LE BVDV EN PRATIQUE

Ainsi en ce qui concerne le BVDV, la mise en évidence d'anticorps permet de détecter les animaux qui ont été infectés et qui ont réagi en activant leurs défenses et en produisant ces anticorps. Leur système immunitaire est considéré comme compétent lorsque leur sérologie est positive (présence d'anticorps contre le BVDV). La présence ou l'absence d'anticorps dans un troupeau permet de déterminer si oui ou non le virus a déjà affecté les animaux. Tandis que la disparition d'anticorps indique que le virus n'est plus présent depuis un certain temps (Niskanen, 1993; Howard *et al*, 1985).

Une antigénémie positive (détection d'antigènes) permet de déterminer les animaux infectés par le BVDV lors de la prise de sang. Soit ces derniers n'auront pas encore activé leurs défenses (durant 3 à 4 semaines ces animaux sont en virémie transitoire (VT)), soit le virus est considéré comme le soi et aucun anticorps ne sera produit (animaux IPI)⁷. Une fois des antigènes détectés, une nouvelle analyse devra être réalisée 3 à 4 semaines plus tard afin de détecter si l'animal présente toujours des antigènes et dans les mêmes quantités (animal IPI) ou non (animal qui était en VT 3 semaines auparavant et qui a présent est immunisé, son taux d'antigènes diminue progressivement) (Saliki *et al*, 2006).

La méthode ELISA ne permet donc pas de différencier immédiatement les animaux VT des animaux IPI. Les autres avantages et inconvénients de cette méthode sont repris au Point 5 de ce chapitre.

4. LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE

4.1 INTRODUCTION

Le principe de base de la PCR (ou Polymerase Chain Reaction) pour Réaction de Polymérisation en Chaîne est d'utiliser de l'ADN polymérase pour réaliser une réplification *in vitro* d'un ADN cible et en obtenir ainsi des quantités infinitésimales permettant son analyse (Higuchi, 1989).

Les différentes étapes de la réaction PCR sont illustrées à la figure 11. Ces étapes comprennent par ordre chronologique, la séparation en simple brin de l'ADN (la dénaturation) à température élevée ($\pm 95^\circ\text{C}$) suivi de l'hybridation des amorces d'intérêt entre 40 et 70°C et une élongation (amplification proprement dite) à $\pm 72^\circ\text{C}$, grâce à la Taq Polymérase, se liant au simples brins amorcés, et des oligonucléotides (dNTP), en excès dans la solution tampon⁸.

Une fois l'ADN double brin reformé, la PCR est remise à la température de dénaturation pour recommencer en boucle ces trois phases. A chaque cycle, l'ADN d'intérêt présent est multiplié par deux ce qui donne donc une production exponentielle au cours du temps (phase exponentielle). Lorsque des réactifs viennent à manquer, l'amplification est décroissante (phase linéaire) pour tendre vers zéro (phase plateau). Les variations de température sont régulées grâce à un thermocycleur⁸.

Une fois les cycles achevés, l'ADN d'intérêt est amplifié et peut être détecté et quantifié par électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR.

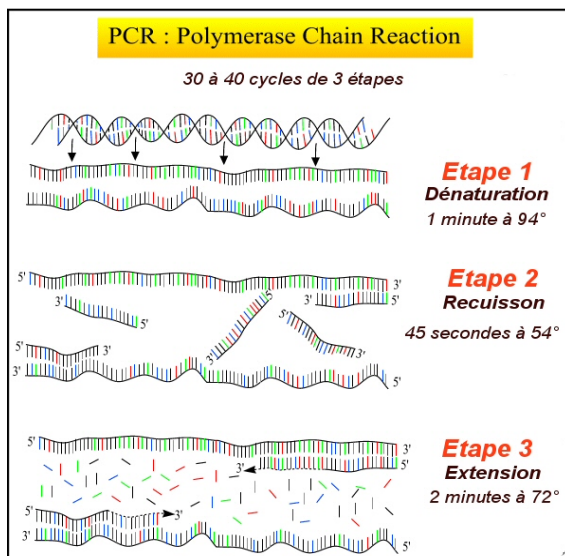


Figure 11: La Réaction de Polymérisation en Chaîne⁹

Lors de la dénaturation les ADN doubles brins se divisent en ADN monocaténaires.

L'hybridation des amorces se fait à une température plus faible.

La Taq polymérase reconstitue de l'ADN bicaténaire grâce aux primers (amorces) et aux dNTP.

Différentes variantes de la technique de PCR initiale ont été développées et en particulier la RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) et qPCR (quantitative PCR), ces méthodes sont reprises au points 4.2 et au point 4.3 suivants.

4.2 LA REVERSE TRANSCRIPTASE-PCR

La PCR transcriptase inverse a pour objectif de produire, à partir d'ARN, de l'ADN complémentaire (ADNc) qui sera ensuite amplifié selon le schéma général de la PCR classique. Des ARNm, étant le matériel à amplifier, et de la Reverse Transcriptase, servant à la production d'ADNc, sont alors ajoutés au mélange réactionnel de base. L'étape préalable consiste à produire des ADNc, suivie des cycles classiques comportant les trois phases d'amplification de l'ADNc obtenu. Cette méthode est beaucoup utilisée pour l'étude de pathologies (en analysant les variations des transcrits) et dans la compréhension des mécanismes de physiologie cellulaire (Bustin, 2000).

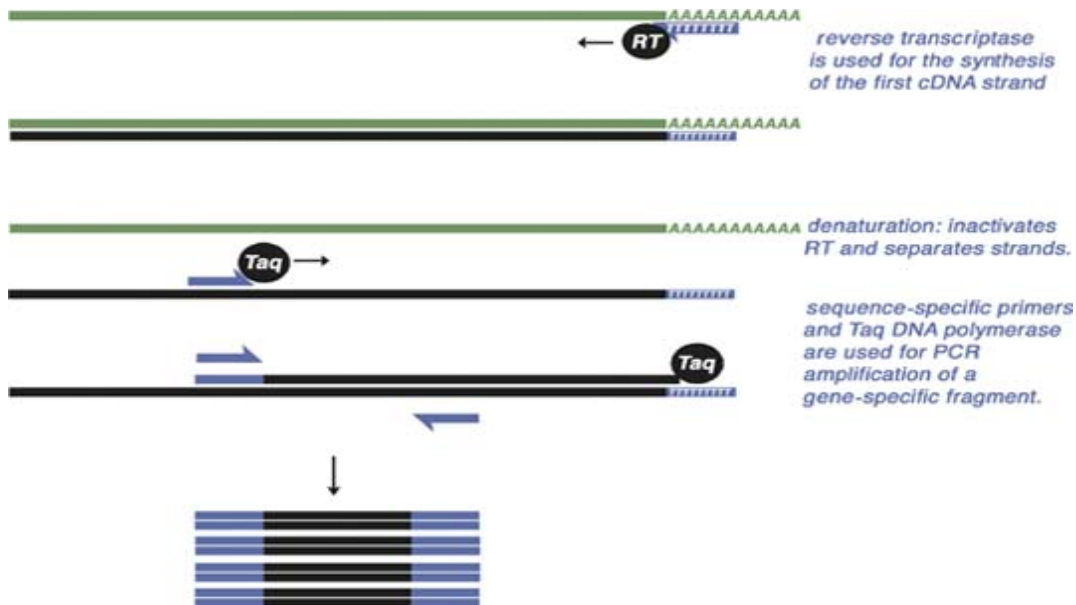


Figure 12 : Principe de la PCR transcriptase inverse (Fraga *et al*, 2008)

4.3 LA PCR EN TEMPS REEL OU PCR QUANTITATIVE

Contrairement à la PCR classique, où une estimation du nombre d'amplicons se fait à la fin du processus (phase plateau) par électrophorèse, la PCR en temps réel permet de détecter la cible dans le produit de la PCR, et de le quantifier, au fur et à mesure qu'il s'accumule, d'où le nom "en temps réel" (Poitras *et al*, 2002).

En principe, un signal fluorescent est émis et détecté à chaque cycle de PCR. Ce signal est directement proportionnelle aux quantités d'ADN (ou ARN) présentes dans le produit PCR. L'émission a lieu lors de la phase d'élongation. En connaissant la quantité d'ADN d'intérêt présent, il est possible d'estimer (avec une grande sensibilité) la quantité de cibles présente dans un échantillon.

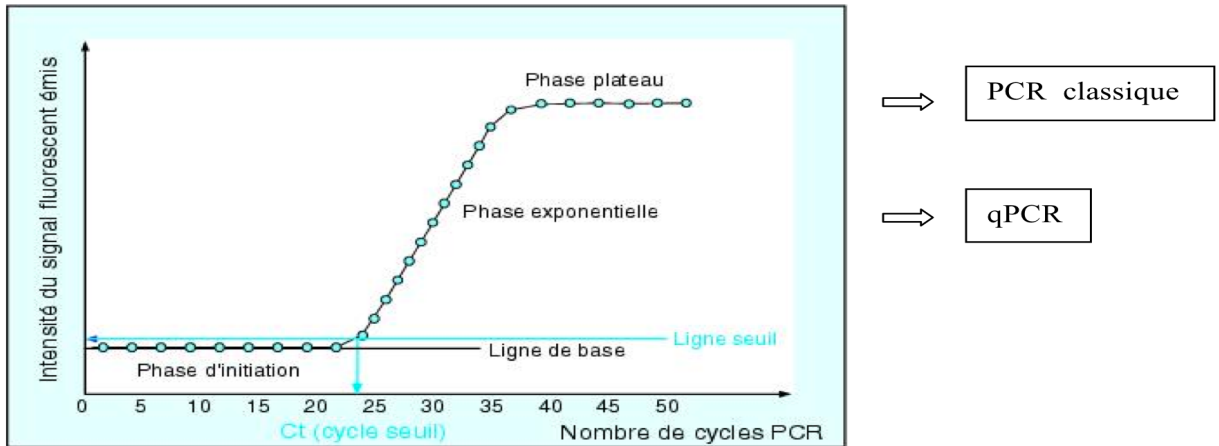


Figure 13: Evolution de la fluorescence (nombre d'amplicons) d'une PCR au cours des cycles. Lors d'une PCR classique la quantification du produit PCR se fait lors la phase plateau par électrophorèse, tandis que lors d'une qPCR la quantification se fait en "temps réel" lors de la phase exponentielle (Tse *et al*, 2003)

Différentes technologies liées à la qPCR ont été développées notamment (Poitras *et al*, 2002) :

La technologie de détection Taqman basée sur l'hydrolyse d'une sonde (ou plusieurs lors d'un multiplexage) portant le signal fluorescent sur l'ADN d'intérêt. Cette méthode à laquelle nous ferons appel est décrite ci-après.

La technologie SYBR Green I dans laquelle la qPCR initiale est basée sur l'ajout d'agents se lient à l'ADN (ex. le Bromure d'éthidium est un agent intercalant) et dont la fluorescence augmente une fois lié à de l'ADN double brin.

La technologie HybProbes met en place deux sondes complémentaires, l'une présente un fluorochrome donneur à son extrémité 3' suivie de l'autre portant un fluorochrome accepteur à son extrémité 5'. Ce n'est que lorsque les deux sondes se retrouvent proches l'une de l'autre (moins de 10 nucléotides) lors de la phase d'hybridation qu'une émission de fluorescence est possible.

La technologie TaqMan

La méthode TaqMan utilise un fluorochrome signal, appelé "reporter" (★) pour émettre la fluorescence. Celui-ci se trouve sur l'extrémité 5' d'une sonde nucléotidique ajoutée au mélange réactionnel de base. Cette sonde est synthétisée au préalable et s'associe sélectivement avec notre ADN d'intérêt entre les séquences où les amorces s'hybrident. A son extrémité 3' se trouve un fluorochrome extincteur ou "quencher" (●) (voir figure 14)¹⁰.

Tant que le signal et l'extincteur se trouvent ensemble sur la sonde, leur proximité induit une absence d'émission. Lors de l'étape d'élongation, la Taq polymérase atteint la sonde et la dégrade par son activité nucléase 5'-3' intrinsèque, ce qui lève l'inhibition du fluorochrome signal. Vu que chaque brin nouvellement répliqué émet une fluorescence, le taux de fluorescence est proportionnel à la quantité d'amplicons générés (Poitras *et al*, 2002). L'intensité de l'émission est mesurée à chaque cycle grâce à un système de lecture optique combiné au thermocycleur.

4.4 DEFINITIONS CLES POUR L'INTERPRETATION DES RESULTATS

Le cycle seuil

Le cycle seuil ou *threshold cycle* (Ct) représente le nombre de cycles nécessaire pour atteindre le point où l'intensité de la fluorescence est statistiquement et significativement plus élevée que celle du bruit de fond (le seuil de fluorescence). Au plus il y a de matrice, au moins le bruit de fond est important par rapport à celle-ci et au moins élevé devra être le nombre de cycle pour atteindre le Ct (Poitras *et al*, 2002).

Ce point est mesuré lors d'une qPCR et apparaît toujours au cours de la phase exponentielle, il n'est donc pas affecté par l'épuisement des réactifs (comme dans la phase plateau). Ce qui explique la reproductibilité élevée d'une PCR en temps réel (Poitras *et al*, 2002).

Généralement, une droite étalon est formée à partir de diverses dilutions successives d'un standard homologue externe (voir la quantification absolue) pour lequel le Ct est déterminé (Figure 15).

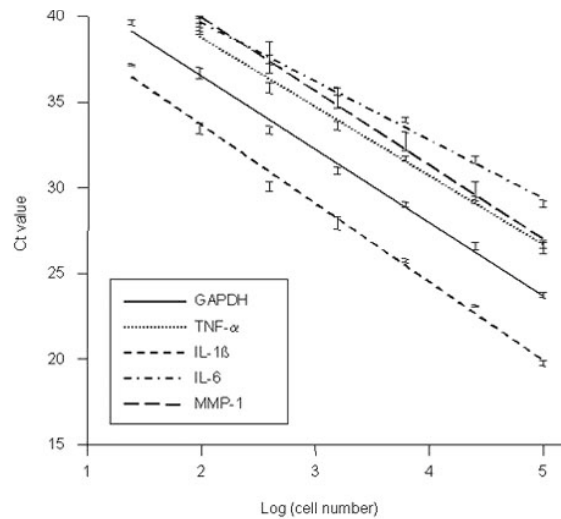


Figure 15: Droites étalons obtenues pour cinq molécules différentes (Boyle, 2003)

L'efficacité de la réaction

La pente de cette droite étalon nous donne une idée de l'efficacité de la réaction ou de l'amplification (E) qui s'obtient par:

$$E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$$

En théorie, lorsque l'efficacité est de 100%, un Ct de différence correspond à une dilution 2 fois plus importante. Le nombre final de molécules d'ADN obtenu est de:

$$N = N_0 \cdot 2^n,$$

avec N = nombre final de molécules, N_0 = le nombre initial de molécules et n = le nombre de cycles d'amplification.

En pratique, cette efficacité oscille entre 0 (pas d'amplification) et 1 (à chaque cycle, chaque molécule d'ADN nouvellement produite génère 2 amplicons). En moyenne, elle est inférieure à 1 et se trouve entre 0,78 et 0,97 (Tse *et al* , 2003).

Le nombre de molécules au final est donc fonction de l'efficacité de la réaction et se trouve par:

$$N = N_0 \cdot (1+E)^n$$

Des facteurs expérimentaux tels que les concentrations de dNTP, la température, les structures secondaires ou contenu en base C/G, la longueur des fragments à amplifier,... peuvent influencer l'efficacité de la réaction.

La quantification absolue

La quantification absolue de la concentration en acides nucléiques ciblés se fait à partir d'une droite d'étalonnage (voir *cycle seuil*). La concentration absolue est exprimée en nombre de copies par μL ou autre unité de concentration (ex. mole/ μL).

Le Ct peut être extrapolé de la droite d'étalonnage validée (E proche de 1 et coefficient de régression linéaire (r^2) $\geq 0,99$, permet de vérifier la reproductibilité du pipetage) et la quantité d'acide nucléique peut alors en être déduite (Tse *et al* , 2003).

Il est important que le standard externe utilisé pour produire la droite d'étalonnage ait une efficacité similaire à celle des échantillons et que la séquence amplifiable soit homologue à la cible. Ceci permet l'utilisation du même couple d'amorce et de la même sonde d'hybridation. Une quantification absolue est donc totalement dépendante du titre du standard employé (Bustin, 2000). Comme il est difficile d'obtenir un standard titré exactement, ce type de quantification est souvent réservé à des applications bien particulières (détection du virus du SIDA et des hépatites B ou C e.a.) (Tse *et al* , 2003).

La quantification relative

La quantification relative se fait après normalisation par rapport à un gène endogène de référence validé ou un calibrant (échantillon servant de référence). La valeur obtenue est exprimée relativement par rapport à la référence choisie et donc dans un rapport cible/référence sous forme d'un indice (voir plus loin *La normalisation*).

Le gène de référence permet la normalisation des différences liées à la qualité et à la quantité de l'ADN extrait et met en évidence d'éventuels inhibiteurs de PCR. Cette référence doit être un gène endogène présent en une seule copie et d'expression constante et avoir une efficacité identique à celle des échantillons. Le rapport des résultats obtenus pour le gène cible sur ceux obtenus pour la référence doit ensuite être rapporté à celui d'un calibrant (solution d'acide nucléiques de référence). L'avantage est qu'ici aucun standard externe titré de façon absolu n'est nécessaire (Tse *et al* , 2003).

Les courbes cinétiques

Ces courbes sont générées au cours d'une même série de réactions PCR et sont représentées à la figure 16. Peu importe le mode de quantification (relatif ou absolu), les courbes cinétiques sont comparables après normalisation des fluctuations et après définition d'un seuil de fluorescence commun à toutes les courbes cinétiques (Tse *et al* , 2003).

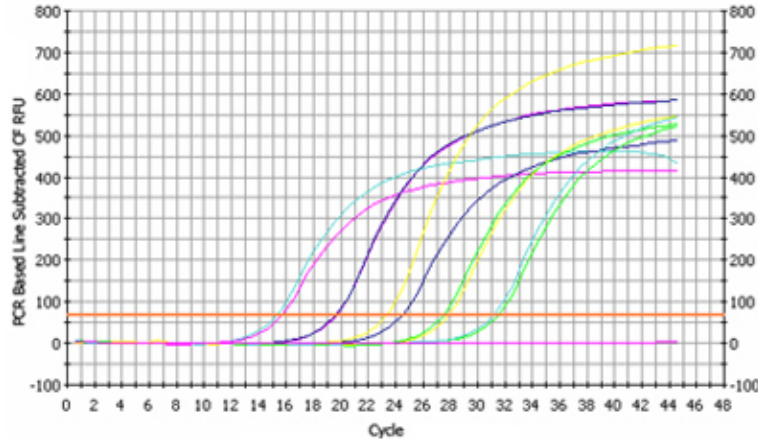


Figure 16: Courbes cinétiques d'une PCR en temps réel¹²

Normalisation

La normalisation permet de corriger les fluctuations de fluorescences lors de modifications de volume ou de concentration (de tube à tube), dues à des erreurs de pipetage ou des différences dans l'illumination des échantillons ou des capuchons des tubes PCR, et de cycle à cycle¹³, la dérive de la lampe émettrice et la dégradation des fluorophores ((Tse *et al* , 2003). La normalisation de la qPCR est obtenue grâce à une référence passive, colorant ne participant pas réellement à la PCR¹⁴, incluse dans la solution tampon. En rapportant l'intensité de la fluorescence émise par le rapporteur à celle émise par cette référence passive, il est possible de corriger ces variations. La valeur relative permet de définir un bruit de fond commun à toutes les courbes cinétiques générées, ce qui facilite la correction des variations de fluorescences au cours de la PCR. R_n (*normalized reporter*) correspond à la valeur relative de l'émission pour un tube défini. R_n^+ correspond à la valeur R_n d'une réaction en incluant la matrice et R_n^- en excluant la matrice. Les équations pour ces 2 valeurs sont reprises ci-dessous.

$$R_n^+ = \frac{\text{Intensité de l'émission du rapporteur}}{\text{Intensité de l'émission de la référence passive}} \quad \text{PCR avec matrice}$$

$$R_n^- = \frac{\text{Intensité de l'émission du rapporteur}}{\text{Intensité de l'émission de la référence passive}} \quad \text{PCR sans matrice premiers cycles d'une qPCR}$$

Finalement ΔR_n représente la magnitude du signal générée par les conditions de la PCR.

Cette valeur se calcule en soustrayant R_n^+ de R_n^- :

$$\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$$

Un résultat positif est défini comme toute valeur supérieure au ΔR_n déterminé par minimum 3 analyses de Contrôles Sans Matrices (No Template Controls) dans des conditions définies.

Il est possible de distinguer les contributions individuelles apportées par chaque fluorescents (reporteurs, quencher et la référence passive) dans le spectre de fluorescences. La lecture de ce spectre composé exprime la fluorescence d'un seul puits.

Le tableau 3 reprend des exemples de fluorescents utilisés.

Tableau 3: Type de fluorescents et exemples¹⁵

Types de fluorescents	Fluorescents
Rapporteurs	FAM™, TET™, JOE™ et VIC®
Quencheurs	TAMRA™, quencher non fluorescents
Référence passive	ROX™, Texas-Red-XTM

4.5 LA PCR ET LE BVDV EN PRATIQUE

Deux approches principales de la détection de l'ARN du BVDV ont été mises en place par LSI (Laboratoire Service Internationale, 2009) et sont décrites ci-dessous.

Le BVDV-Screening

Ce test qPCR permet de détecter la présence d'animaux IPI dans des mélanges de maximum 20 échantillons de sérum ou dans un échantillon de lait provenant d'un tank renfermant la production de 400 vaches. Cette méthode est précédée d'une extraction et d'une purification de l'ARN qui lui donne une sensibilité très élevée. En effet, avec une extraction préalable, les animaux IPI sortent systématiquement avec un Ct inférieur à 35, comme un échantillon est encore détecté IPI à un Ct inférieur à 45, une dilution de 20x (perte de 4,32 Ct), et donc un travail en pool de 20, est possible. Cette méthode est très économique et permet une détection rapide pour énormément d'échantillons (jusqu'à 1.920 (96x20) échantillons de sérum en une analyse), même si l'extraction préalable est un peu plus fastidieuse.

Le BVDV- Fast IPI

Cette méthode permet de détecter, comme son nom l'indique, rapidement si un échantillon provient d'un animal IPI ou non. Aucune extraction ne doit se faire préalablement, ce qui diminue la sensibilité et explique pourquoi uniquement les animaux IPI (ou en début de virémie transitoire) avec un charge virale importante sont détectés.

Comme un résultat représente un seul animal, cette analyse est beaucoup plus coûteuse, mais plus rapide et moins fastidieuse que le *Screening*.

En pratique

Généralement ces deux tests sont réalisés l'un à la suite de l'autre afin de combiner les avantages de chacun. Dans un premier temps, des pools de 20 serums sont analysés par un *BVDV-Screening*. Ensuite, en fonction du nombre de pools détectés positifs, une analyse se fera en pool de 10 ou de 5 échantillons, pour finir par un test *FAST-IPI* individuel des échantillons des pools positifs afin de voir quel(s) animal (animaux) a (ont) rendu le pool positif et sont des IPI.

5. COMPARAISON DES 3 METHODES

Ce qui importe pour une analyse c'est qu'elle soit rapide, précise et peu coûteuse, d'où l'intérêt de comparer les trois méthodes citées précédemment, à savoir l'isolation virale, l'ELISA et la qPCR. L'avantage principal de l'ELISA et de la PCR, est leur sensibilité (probabilité de ne pas voir apparaître des "faux négatifs") élevée (surtout pour la PCR). La spécificité (probabilité de ne pas voir apparaître des "faux positifs") de l'ELISA n'est pas aussi intéressante, car avec cette technique l'anticorps peut parfois réagir avec un antigène non spécifique ce qui fausse le résultat. La qPCR détectant le matériel génétique du virus ne rencontre pas ce genre de problème et a donc une spécificité élevée. Sans oublier que la quantification est beaucoup plus précise avec cette dernière (Hilbe *et al*, 2007).

En Suisse, Rüfenacht *et al*. ont évalué la prévalence et la sensibilité des 3 méthodes utilisées pour la détection du BVDV. Une partie de leurs résultats est reprise dans le tableau 4 et 5 et met en évidence la sensibilité élevée de la qPCR par rapport à l'ELISA et l'isolement virale (Rüfenacht *et al*, 2000).

Tableau 4: Dilutions d'un plasma animal IPI (positif en Ag) dans du plasma BVDV Ag négatif et BVDV Ac positif

Dilutions	Isolement viral	ELISA Ag	qPCR
1/1	+	+	+
1/10	+	+/-	+
1/100	+/-	Nég	+
1/1000	Nég	Nég	+/-
1/10000	Nég	Nég	Nég

Tableau 5: Dilutions d'un plasma animal IPI (positif en Ag) dans du plasma BVDV Ag négatif et BVDV Ac négatif

Dilutions	Isolement viral	ELISA Ag	qPCR
1/1	+	Nég	+
1/10	+/-	Nég	+
1/100	Nég	Nég	+
1/1000	Nég	Nég	+/-
1/10000	Nég	Nég	Nég

Il faut également remarquer que le dosage des anticorps et antigènes connaît peu de risques de contaminations (si tout se fait dans des bonnes conditions) lors des prélèvements sanguins sur les animaux et lors de l'analyse au laboratoire. Les virus pouvant se trouver un peu partout (air, sécrétions,...), les risques de contamination sont plus élevés avec la technique de qPCR¹⁶. Mais la propriété des virus de se retrouver généralement dans de nombreuses matrices font de la qPCR un outil de choix (la qPCR peut utiliser presque toutes les matrices possibles (sang complet, sérum, organes, lait, matières fécales)) au contraire de l'ELISA qui ne sait utiliser des échantillons de sang complet ou de sérum et de lait et dans de rares cas des échantillons de peaux (Renshaw *et al*, 2000).

La méthode immunologique est peu coûteuse et peut même être réalisée sur le terrain contrairement à la deuxième (Hilbe *et al*, 2007). Quant à la réalisation d'une PCR, elle est plus fastidieuse et elle conduit à la manipulation d'acides nucléiques très sensibles à la dégradation (surtout l'ARN). De plus le mélange réactionnel peut facilement être inhibé par la présence de contaminants¹⁷.

Finalement, la PCR peut détecter de manière très précoce le virus après une infection. De plus, sur les jeunes animaux (< 6 mois) l'ELISA n'est pas suffisante car il y a des risques d'interférence avec les anticorps maternels toujours présents (Carman, 2005). Par contre, cette dernière nous permet de déterminer si notre animal a, oui ou non, été infecté dans le passé, ce que la PCR est incapable de faire.

Un tableau récapitulatif des différences entre les 3 méthodes citées dans ce chapitre est repris ci-dessous (tableau 6).

Tableau 6: Comparaison de l'isolation virale, de l'ELISA et de la qPCR pour la détection du BVDV

	Isolation virale	ELISA	qPCR
Sensibilité	Elevée	Elevée	Elevée
Spécificité	Moyenne	Faible	Elevée
Vitesse	Lent	Rapide	Rapide
Coût	Faible	Moyen	Moyen
Mise en œuvre	Fastidieuse	Simple	+/- Fastidieuse
Quantification	Peu précise	Peu précise	Précise
Risque de contamination	Elevé	Faible	Elevé
Matrices	Sang complet, sérum, organes, lait, matières fécales	Sang complet, sérum, lait	Sang complet, sérum, organes, lait, matières fécales
Détection précoce	Oui	Non	Oui
Détection d'infections dans le passé	Non	Oui	Non

La PCR en temps réel semble présenter plus d'avantages mais l'ELISA apporte une information cruciale supplémentaire (infection dans le passé). De plus, l'erreur n'étant pas inévitable, il est préférable de faire une analyse à partir de 2 ou plusieurs méthodes différentes de détection afin de ne pas condamner un animal sans raison et de bien repérer tous les animaux infectés dans le troupeau.

Chapitre 4 :

Lutte et contrôle du BVDV

<u>1.</u>	<u>PROGRAMMES DE CONTROLE ET D'ERADICATION</u>	<u>28</u>
1.1	DEROULEMENT D'UN PROGRAMME DE CONTROLE ET DE PREVENTION	28
1.2	QUID DES PROGRAMMES D'ERADICATION ?	30
1.3	COUT D'UN PROGRAMME DE CONTROLE ET D'ERADICATION	32
<u>2.</u>	<u>LA VACCINATION</u>	<u>32</u>

1. PROGRAMMES DE CONTRÔLE ET D'ÉRADICATION

Suite à la détection du BVDV au sein d'un troupeau ou d'une exploitation, des décisions devront être prises afin de contrôler la maladie et son impact économique. Le plus souvent le BVDV est contrôlé par éradication, tests sélectifs et abattage, garde d'animaux IPI pour une immunisation active de la population, vaccinations et combinaisons de ces méthodes (Houe, 1999). Le contrôle est soit un programme (semi-)imposé par le pays ou la région, soit une action volontaire et individuelle du fermier (Dufour *et al*, 1999). Il est évident que si tout le pays parvient à éradiquer le BVDV, le risque de réapparition est moins élevé que si seulement certains éleveurs font cet effort. C'est pourquoi, il est important de passer d'une prise de conscience individuelle à une prise de conscience collective ou nationale.

1.1 DEROULEMENT D'UN PROGRAMME DE CONTROLE ET DE PREVENTION

Un programme de contrôle et d'éradication comporte différentes phases et à chaque étape des tests spécifiques de détection du BVDV sont combinés. Dans les troupeaux positifs en BVDV, la validité du diagnostic est fonction du processus d'introduction du virus et de la persistance de la durée de l'infection. Tandis que pour les troupeaux négatifs c'est le temps depuis lequel ils sont *BVDV-free* qui importe (Sandvik, 2005). Pour tout programme, c'est généralement la combinaison la plus économique qui est recherchée.

Les trois grandes étapes (la quatrième étant plus optionnelle) réalisées lors d'une tentative d'éradication du BVDV sont présentées ci-dessous (Houe *et al*, 2006) :

Evaluation du statut du troupeau

Un troupeau peut soit être exempt de BVDV et n'avoir jamais « connu » le virus, soit être exempt de BVDV mais avoir déjà « connu » le virus (90 à 100% des animaux présentent des anticorps contre le BVDV), soit toujours contenir le virus (souvent dû à la présence d'animaux IPI). Afin d'évaluer ce statut, un diagnostic se fait sur un échantillonnage d'individus représentatifs du troupeau.

Le diagnostic peut se faire de quatre manières différentes (Houe *et al*, 2006) :

- A) Par la mesure des anticorps dans le tank à lait, sachant que le niveau d'anticorps contre le BVDV est proportionnel à la prévalence d'animaux séropositifs dans le troupeau. La méthode ELISA a une sensibilité élevée (peu de faux négatifs) mais une spécificité faible (beaucoup de faux positifs) ; il sera donc utile de soumettre les troupeaux considérés comme positifs à des tests ultérieurs.
- B) Par la mesure soit des anticorps chez des animaux pris individuellement ou sur des pools de sérum/plasma de jeunes animaux. Chez les jeunes animaux, le taux d'anticorps diminue très vite (ils deviennent négatifs en anticorps en quelque mois) dès que les derniers animaux IPI sont éliminés (contrairement aux taux d'anticorps dans le tank à lait qui peuvent prendre des années pour diminuer significativement). C'est pourquoi les animaux âgés de 6 à 8 mois sont importants pour détecter les faux positifs obtenus précédemment. Afin d'avoir des résultats fiables, il faudra choisir des animaux représentatifs du troupeau (et non des animaux récemment achetés).

- C) Pour les troupeaux vaccinés, lors de l'utilisation de vaccins inactivés le taux d'anticorps est plus élevé dans des troupeaux avec des animaux IPI que ceux sans IPI. C'est sur ce principe que la présence d'animaux IPI est évaluée à partir du nombre d'animaux avec un taux d'anticorps élevé.
- D) Par la détection du virus dans le tank à lait à partir d'une PCR. Le virus se retrouve dans le lait lorsque ce dernier est secrété par un animal IPI. Comme les animaux IPI se retrouvent surtout parmi les jeunes individus (pas encore en lactation), cette méthode ne permet pas de mettre en évidence tous les IPI mais peut être utilisée comme test initial à la détection de ces animaux dans un troupeau laitier.

Evaluation individuelle des animaux infectés dans des troupeaux positifs

Une fois la présence d'animaux IPI détectée par les méthodes décrites précédemment, il est important d'étudier individuellement ces animaux. Ceci pourra être réalisé soit sur base de manifestations cliniques présentes chez ces animaux, soit sur base d'un diagnostic lorsque les signes cliniques ne sont pas apparents (Houe *et al*, 2006).

- A) En fonction des signes cliniques observés et enregistrés une méthode de diagnostic sera choisie. Le tableau 7 reprend les différentes possibilités.

Tableau 7 : Diagnostic des signes cliniques majeurs d'une infection au BVDV (Houe *et al*, 2006)

Stade de l'infection ou de la maladie	Manifestations cliniques*	Réponse en anticorps	Détection du virus
Infecté par le BVDV, en virémie transitoire	Subcliniques, diarrhée, possibilité de mortalité élevée quand BVDV de type 2	Détection après 2 à 3 semaines, peuvent rester séropositifs à vie	Dans les 1ers jours à 1 ou 2 semaines après l'infection
Avortement	Soit immédiatement soit plusieurs mois après une infection par le BVDV	Soit la séroconversion peut se détecter, soit la femelle est positive	Le fœtus peut être positif en BVDV
Malformations congénitales	Hydrocephalus et autres	Fœtus souvent positif en anticorps	Fœtus peut être positif
Mortalité néonatale	Veaux faibles ou mort-nés	Parfois	Parfois
Animaux IPI	Normaux/Donnant une production moindre	Négative	Positif
Maladie des muqueuses	Négative	Séronégatif	Présence du virus et d'une souche cytopathogène

*Quelques exemples sont donnés. L'ensemble des signes cliniques a été publié (Backer, 1995).

- B) Cas où aucun signe clinique n'est observable.

Dans ce cas, les animaux âgés entre 3 et 9 mois sont testés en plus de certaines vaches. Si aucun jeune animal n'est IPI, ceci signifie que les mères ne le sont pas non plus (une mère IPI donnant automatiquement naissance à un veau IPI). Ensuite, toutes les mères des animaux positifs et les vaches sans veaux dans le troupeau devront être testées. Les inconvénients de cette méthode sont liés à la tenue rigoureuse des registres des animaux et qu'en identifiant le virus (et non les anticorps), il est difficile de trouver les animaux IPI éventuellement non identifiés. Il est alors souvent préférable de réaliser une première étape de screening de tous les animaux par la détection d'anticorps et ensuite, se concentrer sur les animaux à sérologie négative.

Evolution vers un statut « BVDV-free » et maintien

L'assainissement permet d'obtenir une exploitation exempte de BVDV. Cette étape correspond à l'élimination (par abattage) de tous les animaux détectés comme IPI (y compris ceux au stade fœtal) et l'abattage ou l'isolation des animaux en virémie transitoire (Sandvik, 2005; Houe *et al*, 2006).

Juste après l'élimination des IPI, la plupart des animaux ont une sérologie positive (obtenue suite à une infection) et les plus jeunes animaux deviennent rapidement négatifs en anticorps (perte des anticorps colostraux). Le troupeau obtient donc progressivement une sérologie négative à partir des animaux âgés de 6 à 8 mois, d'où la nécessité de faire des contrôles réguliers à partir d'un échantillonnage aléatoire (Houe *et al*, 2006).

Afin de maintenir ce statut BVDV-free, il faut tenir compte de la susceptibilité des animaux et contrôler les achats par des tests de détection sur des échantillons de lait ou de sérum. Si un test s'avère positif des investigations supplémentaires devront avoir lieu.

Des tests sont également effectués au niveau du tank à lait tous les 4 à 6 mois et un contrôle annuel des animaux futurs reproducteurs aura lieu entre 6 mois et l'âge au premier vêlage (Sellal, 11 Juin 2003).

Mesures de biosécurité individuelle

La manière dont cette quatrième étape se réalise varie d'une exploitation à l'autre, voir d'une région ou d'un pays à l'autre. Le but est d'éviter toute transmission entre les troupeaux non infectés et troupeaux infectés. Aucun animal IPI ne doit alors être déplacé dans d'autres troupeaux ou pâtures et ne peut faire acte de tout type de transfert commercial. Les femelles gestantes à sérologie positive doivent être isolées et leur descendance doit être testée. Une dernière règle générale à ces mesures de biosécurité est l'isolation pendant trois semaines de tout animal entrant dans une exploitation, avant qu'il puisse intégrer le troupeau (Houe *et al*, 2006).

1.2 QUID DES PROGRAMMES D'ERADICATION ?

Au niveau Européen

Les premiers programmes d'éradication ont été introduits début des années '90 au Danemark, en Finlande, en Norvège et en Suède. Au départ, ces programmes avaient généralement lieu sur base volontaire et ont ensuite été institutionnalisés par la législation (Houe *et al*, 2006).

Par la suite, l'Autriche et le nord de l'Allemagne suivirent. Ces derniers utilisèrent tout de même la vaccination (contrairement aux pays nordiques) suite à des problèmes de réinfection.

D'un pays à l'autre, la législation varie mais toutes reprennent les 3 premières étapes détaillées précédemment. Certaines règles ne sont appliquées que lors de certaines périodes. Généralement au plus la prévalence diminue, au plus elles deviennent rigoureuses. La législation informe les éleveurs sur le nombre d'animaux à tester et les intervalles de temps entre les tests à respecter. Certains cas particuliers dérochant à la règle générale sont également cités (ex. exploitation avec uniquement des veaux à l'engraissement).

L'encadrement ci-dessous reprend le programme de contrôle et d'éradication du BVDV mis en place au Danemark (Houe *et al*, 2006).

Exemple d'un programme d'éradication au niveau national : Le Danemark

- 1) Evaluation du statut du troupeau
 - a. 2 tests ELISA Ac blocking (détection d'Ac) dans le tank à lait à 2 semaines d'intervalle:
 - soit les 2 tests ont un résultat < 50% → « BVDV-free » → 3)
 - soit au moins un des 2 tests a un résultat > 50% → b.
 - b. Test individuel ELISA Ac Blocking sur 3 jeunes animaux représentatifs du troupeau :
 - soit les 3 animaux sont séronégatifs → « BVDV-free » → 3)
 - soit au moins un animal est séropositif → 2)
- 2) Evaluation individuelle des animaux infectés
But : identifier et éliminer les animaux IPI
Après identification et élimination des IPI + séronégativité contrôlée des jeunes animaux → « BVDV-free » → 3)
- 3) Maintient et contrôle du statut BVDV-free
Le statut négatif doit être confirmé annuellement par des tests ELISA Ac Blocking sur 3 jeunes animaux représentatifs du troupeau. Après quelques années un test ELISA Ac Blocking est réalisé sur le tank à lait.

En Belgique:

Un programme national d'éradication et de contrôle du BVDV n'a toujours pas été implémenté à ce jour. Uniquement des stratégies de détection et d'éradication des animaux IPI ont été développées en Flandre et en Wallonie. Celles-ci ont été mises en place par les centres de contrôles respectifs des maladies animales des deux régions. En Wallonie, la détection se fait par des tests individuels ELISA à détection d'antigènes et/ou des tests qPCR BVD screening par pools d'animaux. En Flandre, uniquement le BVD screening est pratiqué (Letellier *et al*, 2005). En 2003, une analyse de la situation wallonne montre que 13% des troupeaux présentent le BVDV et 1,9% des animaux totaux testés sont positifs. En Flandre, la proportion de troupeaux atteints est plus élevée (32%), il en est de même pour les animaux (14%) (Letellier *et al*, 2005).

De nos jours, la situation ne s'est pas améliorée et la prévalence du BVDV en Belgique (ainsi qu'aux Pays-Bas et en Angleterre) est encore très élevée. De plus, la densité élevée des élevages et les nombreux transports commerciaux rendent cette situation problématique pour les autres pays européens qui sont parvenus à éradiquer la maladie (Houe *et al*, 2006).

C'est pourquoi il est urgent, qu'en Belgique (et dans les autres pays voisins) un programme volontaire de contrôle du BVDV se mette en place. Ce dernier devrait également être accompagné de mesures légales, principalement pour ce qui concerne la certification « exempt d'animaux IPI ». Entre temps, étant donné qu'aucune approche nationale n'est installée, il est fortement conseillé d'éliminer les IPI et de pratiquer la vaccination (Laureyns *et al*, 2009).

Au niveau international

En Europe, la Commission Européenne a créé un réseau thématique sur le contrôle du BVDV, qui permet de rassembler des spécialistes dans différents domaines concernant le BVDV. Le but étant d'améliorer la situation en Europe par l'échange de données et la mise en place de programmes de contrôle (Gunn, 2005). Aux Etats-Unis, malgré les mesures prises pour l'éradication des animaux IPI, la lutte contre le BVDV est loin d'être une réussite (Fulton *et al*, 2009). Bien souvent, les mandats émis par le gouvernement prennent plus de temps que le transport des animaux, les éleveurs perdant patience achètent des animaux sans réception de certification. Les sites de prévention contre le BVDV préconisent de n'accepter des animaux ne

provenant que de population *BVDV-free*, mais ceux-ci étant peu nombreux, en pratique cette recommandation est difficilement applicable¹⁸.

Pour ce qui est des pays en voie de développement, ils sont peu informés en ce qui concerne l'épidémiologie et l'impact du BVDV. Heureusement, une prise de conscience se met en place et de plus en plus d'études et d'enquêtes sérologiques sont réalisées dans plusieurs pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Sud (Kampa *et al*, 2004).

1.3 COUT D'UN PROGRAMME DE CONTROLE ET D'ERADICATION

Si de plus en plus, des programmes nationaux d'éradication se mettent en place, certains auteurs doutent encore de leur rentabilité. Il a pourtant été prouvé, par des exemples concrets décrits ci-dessous, que ces programmes permettaient des retours financiers importants pour les pays qui les mettaient en place.

C'est ainsi qu'au Danemark, les coûts du contrôle s'élevaient à 9 millions de dollars par an les trois premières années du programme pour diminuer à 3.5 millions de dollars la quatrième année. Mais les bénéfices de cette stratégie pour l'agriculture sont estimés à 20 millions de dollars (Bitsch *et al*, 1995; Houe, 2003).

En Norvège, le programme national de contrôle et d'éradication, de 1993 à 1997, permit un gain de 6 millions de dollars avec une diminution importante de l'impact économique du BVDV dès la deuxième année. En 2003, la Norvège est d'ailleurs proclamée *BVDV-free*, une réussite totale (Valle *et al*, 2000; Houe, 2003).

Pourtant en France, Dufour *et al*. (1999) prétendent qu'un tel programme n'est efficace et rentable qu'après 15 ans. Ann Lindberg (2002) contredit cette étude, en insistant qu'une éradication limitée et raisonnée ou l'arrêt des vaccinations BVD peuvent à eux seuls financer les coûts des plans de contrôles et d'éradication.

2. LA VACCINATION

Dans les pays européens et autres, où des plans d'éradication ne sont pas mis en place, la vaccination est le seul moyen de contrôle du BVDV. Souvent considérée comme insuffisante, elle est parfois nécessaire lorsque la prévalence du virus est trop importante. Dans certains cas, la vaccination est donc combinée aux programmes de contrôle et d'éradication (Houe *et al*, 2006). Des vaccins vivants atténués (Risposal BVD et RS-BVD (Pfizer GmbH)) et inactivés (Mucobovin (Merial GmbH), Bovillis (Intervet Deutschland GmbH)) existent dans le commerce; toutefois, leur efficacité est variable. La vaccination concerne principalement les animaux reproducteurs. Les vaches et génisses reçoivent 2 injections à 3 semaines d'intervalle avant la saillie (primovaccination). Ensuite, les rappels de vaccination sont administrés 2 semaines avant la fécondation (Thiry, 2007). Pour les génisses, il est également possible de pratiquer une primovaccination à l'âge de 6 mois, après que l'immunité maternelle ait disparu. Ensuite, juste avant la saillie, une injection de rappel a lieu (Thiry, 2007). Les vaccins protègent l'animal en induisant la production d'anticorps contre la glycoprotéine E2. Il est important que les souches utilisées permettent une immunisation contre le large spectre de souches présentes dans la région ciblée (Thiry, 2007).

Partie 2 : Objectifs

Cette partie reprend les objectifs visés suite aux conclusions faites lors de la recherche bibliographique.

Objectifs

Suite à la recherche bibliographique, laquelle a conclu qu'une infection au BVD mène à des conséquences économiques néfastes, d'où l'importance de sa détection, et la faible efficacité des structures sanitaire en Bolivie, les objectifs sont les suivants:

- A) Déterminer s'il y a du BVDV dans la région de Cochabamba dans les élevages de bovins et dans la région de La Paz dans les élevages de lamas.
- B) Voir s'il est possible de développer et implémenter les méthodes de détection utilisées chez nous, en Bolivie (méthodes immunologiques et moléculaires).
- C) Voir quels points doivent être améliorés ou solutionnés.

Partie 3: Matériel et Méthodes

Cette partie est consacrée à l'énumération et l'explication du matériel et des méthodes utilisés afin de répondre aux objectifs cités à la partie 2. Elle reprend la méthodologie générale, les exploitations et animaux concernés, la prise d'échantillons, et les méthodes de détection immunologiques et moléculaires.

Matériel et méthodes pour la détection du BVDV

1. INTRODUCTION	34
2. LES TROUPEAUX ET LA REGION	34
3. PRISE D'ECHANTILLON	34
4. PREPARATION DES ECHANTILLONS ET CONSERVATION	35
5. ELISA DE COMPETITION ANTI-ANTICORPS	36
5.1 OBJECTIFS	36
5.2 PRINCIPE	36
5.3 METHODE	36
6. ELISA DE TYPE SANDWICH ANTI-ANTIGENES	37
6.1 OBJECTIF	37
6.2 PRINCIPE	37
6.3 METHODE	37
7. BVDV-SCREENING DE TOUT LE TROUPEAU PAR QPCR	38
7.1 OBJECTIF	38
7.2 PPRINCIPE	38
7.3 METHODE	38
8. QPCR FAST-IPI INDIVIDUELLE	40
8.1 OBJECTIF	40
8.2 PRINCIPE	40
8.3 METHODE	40

1. INTRODUCTION

La mise en place d'un système de détection du BVDV comprend une prise d'échantillons, suivi d'une préparation des échantillons et la détection proprement dite. Cette dernière, comme introduit dans la partie 1, Chapitre 3, peut se faire grâce à des méthodes immunologiques (tests ELISA) et/ou grâce à des méthodes moléculaires (tests de PCR quantitative) repris ci-dessous.

2. LES TROUPEAUX ET LA REGION

L'analyse se fait au sein de deux troupeaux de bovins de la région de Cochabamba et au sein de deux troupeaux de lamas de la région de La Paz (Communauté de Quipaquiapani).

Les troupeaux de bovins :

- La Granja Modelo de Pairumani est une exploitation de plus de 140 Holstein, quelques chevaux et hectares de culture. C'est une ferme pilote, qui met en place un maximum de conditions de bien-être pour les animaux et une alimentation en concordance avec leur production élevée. Les animaux sont en stabulation libre à l'extérieur avec une partie recouverte et une aire bétonnée.
- La Granja de Don Gabriel est une petite ferme traditionnelle, avec une vingtaine de vaches laitières de type Holstein non racées et un élevage de cochons d'inde. Une partie des animaux est attachée avec une corde à une structure et une autre partie est en stabulation libre, toutes sur une aire non bétonnée.

Les troupeaux de lamas sont contenus en clôture étroite pendant la nuit et broutent librement dans les environs le jour.

3. PRISE D'ECHANTILLON

Pour la réalisation des analyses tant de type immunologique que moléculaire des prélèvements sanguins sont réalisés dans des tubes de 2 ml renfermant comme anticoagulant un maximum de 1% d'EDTA sachant que l'héparine ne peut être employée compte tenu de l'inhibition de la PCR qu'elle induit. Les tubes de prélèvement sont conservés au réfrigérateur en attendant leur utilisation.

Chez le bovin, la prise de sang est réalisée au niveau de la queue (voir figure 1) alors que chez le lama, le sang est prélevé soit au niveau d'une cuisse intérieur, soit au niveau de la jugulaire (voir figure 2 et 3)



Figure 1 : Prise de sang sous la queue (vache)



Figure 2 : Prise de sang au niveau de la jugulaire (lama)



Figure 3 : Prise de sang au niveau de la cuisse intérieure (lama)

4. PREPARATION DES ECHANTILLONS ET CONSERVATION

Après le prélèvement, les échantillons sont conservés au réfrigérateur à $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Le plasma est ensuite extrait d'un des 2 tubes de 2ml récoltés par centrifugation à 10000rpm - 20 minutes (Réf: Thermo Electron Corporation, IEC Micromax Microcentrifuge). Le plasma est ensuite congelé et peut se garder plusieurs mois à -20°C . Le deuxième tube (sang + EDTA) est conservé à $4 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant maximum 8 jours.



Figure 4 : Echantillons de sang avant centrifugation



Figure 5 Centrifugeuse

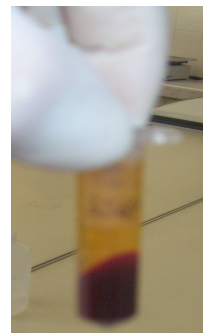


Figure 6 : Echantillons de sang après centrifugation (plasma + sérum)

5. ELISA DE COMPETITION ANTI-ANTICORPS

5.1 OBJECTIFS

La recherche d'anticorps anti-BVDV dans les échantillons prélevés a pour objectif d'identifier à partir d'un échantillon représentatif d'un troupeau, si une infection préalable par le BVDV a eu lieu ou si le virus est toujours présent.

5.2 PRINCIPE

La détection des anticorps, si aucune vaccination n'a eu lieu, nous permet de prédire si un troupeau a déjà été infecté par le BVDV. Sur un échantillon aléatoire représentatif du troupeau, si tous les échantillons sont 100% séronégatifs, il est inutile de tester l'ensemble du troupeau puisque les résultats indiquent avec une bonne probabilité que la maladie n'a jamais atteint le troupeau. Par contre, si des individus analysés s'avèrent séropositifs, deux hypothèses peuvent être formulées à savoir :

- soit le troupeau a acquis une immunité naturelle suite à une infection préalable,
- soit une circulation virale est en cours.

5.3 METHODE

Le kit « LSIVET BVD/BD p80 BLOCKING ONE STEP » de LSI permet de détecter la présence d'anticorps contre le BVDV. Ces anticorps sont mis en évidence par une ELISA de compétition de type directe (voir chapitre 2, point 3.2). L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps contenus dans les échantillons. Le résultat se lit à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA à 450 nm en monochromatisme (Réf : Awareness Technology Inc. Stat-fox-2100).

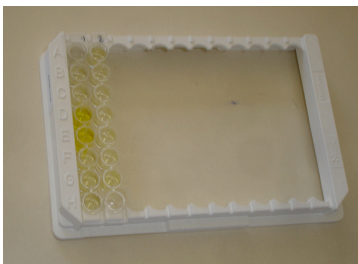


Figure 7 : Plaquette ELISA avant la lecture



Figure 8 : Lecteur ELISA

Remarque: les animaux de moins de 6 mois ne sont pas testés dû aux possibles interférences avec les anticorps maternels, ce qui fausserait le résultat.

Validation du test

La DOM (Densité optique moyenne) des 2 contrôles négatifs doit être supérieure à 0,650 et le pourcentage d'intensité lumineuse des contrôles positifs supérieur à 60%.

Les pourcentages d'intensité lumineuse (%Inh) des échantillons et du contrôle positif sont calculés selon la formule:

$$\% \text{ Inh} = \frac{\text{DOM CN} - \text{DO échantillon}}{\text{DOM CN}} \times 100$$

Interprétation des résultats

Le tableau 1 fournit la grille d'interprétation des résultats en établissant une grille de concordance entre le % Inh (obtenu à partir de la DO) et le statut de l'animal en BVD

Tableau 1 : Interprétation des résultats obtenus par une analyse ELISA anti-anticorps

	Interprétation quantitative	Interprétation qualitative	Statut de l'animal
% Inh < 50	-	Echantillon NEGATIF	Indemne ou IPI
50 ≤ % Inh < 80	+	Echantillon faible POSITIF	Animal Immun, Probablement non-IPI si âge > 6mois
% Inh ≥ 80	++	Echantillon fort POSITIF	

6. ELISA DE TYPE SANDWICH ANTI-ANTIGENES

6.1 OBJECTIF

L'objectif poursuivi dans le recours à un test ELISA détection d'antigène consiste à identifier les animaux à antigénémie positive.

6.2 PRINCIPE

Une analyse ELISA de détection d'antigènes nous permet de savoir quel animal est encore porteur du virus. Pour les animaux appartenant aux pools détectés négatifs avec le test qPCR BVD-*Screening* (point 7) (aucun animal du pool ne contient le virus) et pour ceux à sérologie négative (les défenses sont actives, le virus n'est (presque) plus présent), cette analyse n'est pas requise puisque le virus est soit absent, soit en phase de disparaître.

Sachant qu'au cours du temps, les animaux en virémie transitoire voient leur taux d'antigènes diminuer en raison de la production d'anticorps qui les neutralisent et que les animaux IPI gardent un taux d'antigènes identique ou plus élevé, il est possible à partir d'une seconde analyse ELISA réalisée 3 à 4 semaines plus tard, de différencier ces deux types d'animaux en fonction du nouveau taux d'antigènes obtenu.

6.3 METHODE

La méthode utilisée consiste en un test ELISA de type sandwich directe en faisant appel au kit « LSIVET BVD/BD ANTIGEN CAPTURE-SKIN L.O. » (version BVDSK 001 – 210809) de LSI. Dans le cas présent, l'intensité de la coloration développée lors de la réaction immunologique est proportionnelle au taux d'Ag présent dans les échantillons de sang (leucocytes).

Le test est considéré comme valide lorsque la DOM mesurée pour l'échantillon contrôle positif est supérieure à 0.800 et que la DOM du contrôle négatif est inférieure à 0.300

L'interprétation des résultats générés se fait suivant le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : Interprétation des résultats obtenus par une analyse ELISA anti-antigènes

DOc	Interpretation
> 0,4	Positif
$0,4 \geq \text{DOc} \geq 0,3$	Douteux
$\text{DOc} < 0,3$	Négatif

Avec DOc = DO Corrigée = DO Ech – DOm CN

7. BVDV-SCREENING DE TOUT LE TROUPEAU PAR QPCR

7.1 OBJECTIF

L'objectif poursuivi dans l'utilisation de la PCR quantitative est de pouvoir détecter la présence éventuelle d'animaux présentant une infection active au BVDV.

7.2 PPRINCIPE

La PCR quantitative dite *BVDV-Screening* permet la détection de l'ARN viral dans des pools de sérum de maximum 20 individus. Si tous les pools s'avèrent négatifs, l'interprétation des résultats conclut à l'absence d'animaux porteurs du virus BVD vivant; on peut alors décréter que le troupeau est sain au moment des prélèvements et qu'il n'est pas nécessaire de procéder à d'autres analyses. Lorsqu'un pool ressort comme positif après la PCR, cela signifie qu'au moins un des sérums utilisés pour faire les mélanges est issu d'un animal infecté par du virus BVD vivant. Des tests additionnels sont donc indispensables pour identifier le (ou les) animaux infectés et doivent permettre également de répertorier si on est devant un animal virémique transitoire ou un animal IPI.

7.3 METHODE

Préalablement à l'analyse, un aliquot de chaque plasma est prélevé pour constituer un mélange de 20 échantillons.

La première étape de l'analyse consiste à extraire l'ARN des échantillons mélangés à l'aide du kit « Quiagen RNeasy Mini-kit » de LSI. Ce kit réalise en premier lieu une lyse de cellules suivie d'une homogénéisation et de l'ajout d'éthanol pour mettre le lysat dans de bonnes conditions de liaison. Ce lysat est ensuite chargé sur une membrane de silicone afin d'en éliminer efficacement les contaminants et autres reliquats et ainsi obtenir un ARN pur et concentré qui sera au final élué dans de l'eau *RNase-DNase free*.

Le tableau 3 reprend les rendements d'extraction obtenus sur différentes matrices à partir de ce kit.

Tableau 3 : Rendement moyen d'extraction d'ARN avec le kit "Quiagen RNeasy Mini-kit"

Cellules animales	Rendements moyens (en µg)
LMH (1x10 ⁶)	12
HeLa (1x10 ⁶)	15
COS-7 (1x10 ⁶)	35
Lymphocytes (non-stimulés) (1x10 ⁶)	0,5

En parallèle à l'extraction de l'ARN des échantillons, un EPC (Contrôle Positif Externe) fournit dans le kit *BVDV-Screening*, un NCS (Contrôle Négatif des Echantillons) et de l'eau, suivent les différentes étapes d'extraction. Le premier contrôle nous permet de vérifier la valeur attendue d'un échantillon positif et donc de s'assurer que l'extraction de l'ARN a fonctionné correctement. Le deuxième contrôle nous permet de vérifier la valeur attendue d'un échantillon négatif et donc de s'assurer de l'absence de contaminations au moment de l'extraction et de l'amplification.

Dans une seconde étape, les produits d'extraction (l'ARN pour les échantillons, l'EPC et le NCS extraits) sont mis en contact avec la solution *BVDV-MIX* du Kit « TaqVet™ BVDV Screening » (réf: B12S) contenant tout le matériel nécessaire à la réalisation de la RT-PCR en temps réel (tels que les sondes BVDV et IPC, les desoxyribonucléotides, les primers et reverse primers, ...).

Finalement, le thermocycleur (Réf : Slan Real Time PCR detection system) est programmé de sorte à avoir les cycles suivants:

- 48 minutes à 30°C pour la reverse transcription
 - 10 minutes à 95°C pour la dénaturation et l'activation de la Taq Polymerase
 - 15 secondes à 95°C pour la dénaturation
 - 1 minutes à 60°C pour la fixation des primers et l'élongation
- } 45 fois

Deux détecteurs sont utilisés et attribués à chaque échantillon :

- BVDV : Reporter FAM, Quencher ; NONE (non fluorescent)
- IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA

Un deuxième contrôle négatif (NC) constitué uniquement du *MIX BVD-Screening* permettra de vérifier l'innocuité de ce *MIX* et l'absence de contamination lors du dépôt de celui-ci.

Une fois le programme d'amplification achevé la lecture des résultats se fait sur ordinateur à l'aide du programme SLAN 8.0. (LSI).

Les critères de validation de la réaction de qPCR (tableau 4) nécessitent que, tant pour le détecteur IPC, que pour le détecteur BVDV, les valeurs de Ct de l'EPCBVD1 soient inférieures à 45 Ct alors que ces mêmes valeurs doivent être supérieures à 45 Ct pour le NCS. Lorsque ces critères de qualité sont satisfaits, on considère que la réaction de qPCR a correctement fonctionné.

Tableau 4 : Valeurs de l'EPC et du NCB attendues pour la validation de la qPCR *BVD-Screening*

Interprétation	Détecteur BVDV	Détecteur IPC
EPC BVD1	Ct < 45	Ct < 45
NCS	Ct > 45	Ct < 45

En fonction du nombre de Ct observé pour chaque échantillon analysé, on peut interpréter le statut BVD d'un troupeau selon les paramètres repris au tableau 5.

Tableau 5 : Interprétation des résultats de l'analyse qPCR *BVD-Screening* et statut de l'animal en regard du BVDV

Interprétation	Détecteur BVDV	Détecteur IPC
Positif BVDV	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif BVDV	Ct > 45	Ct < 45
Invalide	Ct > 45	Ct > 45

8. QPCR FAST-IPI INDIVIDUELLE

8.1 OBJECTIF

L'utilisation d'un test de qPCR *BVD-Fast IPI* a pour objectif de pouvoir différencier les animaux IPI des animaux virémiques transitoires.

8.2 PRINCIPE

Sachant que les animaux IPI ont un taux d'Ag très élevés, lequel peut augmenter au cours du temps, il est possible d'identifier ces animaux en quantifiant le matériel génétique viral présent dans l'échantillon analysé. Cette analyse se fait soit sur des animaux appartenant à un pool positif en *BVDV-Screening* soit sur des animaux à antigénémie positive.

8.3 METHODE

La recherche des animaux porteurs de BVDV à l'aide du kit *FAST-IPI* se fait exclusivement sur des échantillons en individuel avec l'avantage qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une extraction préalable de l'ARN. Le Kit « TaqVet BVD Fast IPI » (réf : BFIP) de LSI permet une amplification spécifique de la région 5' UTR du génome viral à partir d'échantillons de sérum, de plasma ou de sang total prélevé sur tube EDTA.

Aucune extraction préalable n'est requise, uniquement une dilution des échantillons (et de l'EPC et du NCB (Contrôle Négatif du Buffer)) et une mise en contact avec le *FAST-BUFFER* (contenant l'IPC) ont lieu avant le dépôt du *MIX*. Comme pour le *BVDV-Screening* un contrôle négatif (NC), composé uniquement du *FAST-MIX*, permet de vérifier l'absence de contamination lors du dépôt de ce *MIX*. Le premier contrôle négatif (NCB) permet quant à lui de vérifier l'innocuité lors de l'amplification et lors du dépôt du *FAST-BUFFER*.

Le thermocycleur est programmé de la même manière que pour le *BVDV-Screening* et à nouveau les reporteurs *FAM* et *VIC* sont utilisés pour détecter respectivement le BVDV et l'IPC. Une référence passive *ROX* peut également être nécessaire.

Les critères de validation de la réaction de qPCR sont les mêmes que pour le *BVDV-Screening* repris au tableau 4 précédemment. Le NCS est à présent le NCB.

En fonction du nombre de Ct observé pour chaque échantillon analysé, on peut interpréter le statut BVDV de l'animal analysé selon les paramètres repris au tableau 6.

Tableau 6 : Interprétation des résultats de l'analyse qPCR *Fast-IPI* et statut de l'animal en regard du BVDV

Interprétation	Détecteur BVDV	Détecteur IPC
<u>Suspicion IPI</u> : Animal pour lequel la VPP (Valeur Prédictive Positive) IPI > 99%	Ct BVDV < 35	Ct IPC >45 ou < 45
<u>Animal virémique</u> : Animal dont le statut (IPI ou VT) sera déterminé lors d'une nouvelle analyse réalisée sur un échantillon récolté 3 à 4 semaines plus tard.	35 < Ct BVD < 45	Ct IPC < 45 ou > 45
<u>Négatif</u>	Ct BVD > 45	Ct IPC < 45
<u>Non validé</u>	Ct BVD > 45	Ct IPC > 45

Partie 4: Résultats et Discussions

Cette partie reprendra, les résultats des différents tests et analyses réalisés en Belgique et en Bolivie. Les résultats seront systématiquement suivis d'une brève discussion afin de justifier et d'améliorer la compréhension du pourquoi des tests suivants.

Chapitre 1: Contrôle préalable des kits de détection moléculaire du BVDV

Chapitre 2: Analyses immunologiques et moléculaires réalisées en Bolivie

Chapitre 3: Analyses FAST-IPI supplémentaires réalisées en Belgique

Chapitre 4: Kit de détection moléculaire du BVDV se conservant à température ambiante

Chapitre 5: Recherche d'une méthode de détection du BVDV efficace, rapide et peu coûteuse

Chapitre 1 :

Contrôle préalable des kits de détection moléculaire du BVDV

1. INTRODUCTION	41
2. ESSAI DU KIT BVDV-SCREENING PRODUIT PAR LSI	41
3. ESSAI DU KIT FAST-IPI PRODUIT PAR LSI	42

1. INTRODUCTION

Des kits de mêmes lots que ceux utilisés en Bolivie sont testés chez Progenus (Belgique) avant leur départ. Ces analyses sont réalisées à partir de la sérothèque de Progenus, contenant des échantillons détectés positifs ou négatifs en BVDV. Le contrôle de ces deux kits permettra d'avoir une idée des courbes d'amplification attendues dans les différents cas possibles et ainsi une meilleure interprétation des résultats obtenus en Bolivie.

2. ESSAI DU KIT BVDV-SCREENING PRODUIT PAR LSI

Ce kit permet de détecter la présence d'un (ou de plusieurs) animal(aux) infecté(s) (IPI ou en virémie transitoire) dans un pool confectionné à partir de maximum 20 échantillons de plasma. La figure 1 présente la courbe d'amplification attendue lorsqu'un pool est négatif en BVDV alors que la figure 2 illustre celle d'un pool avec au moins un échantillon positif dans le pool d'échantillon.

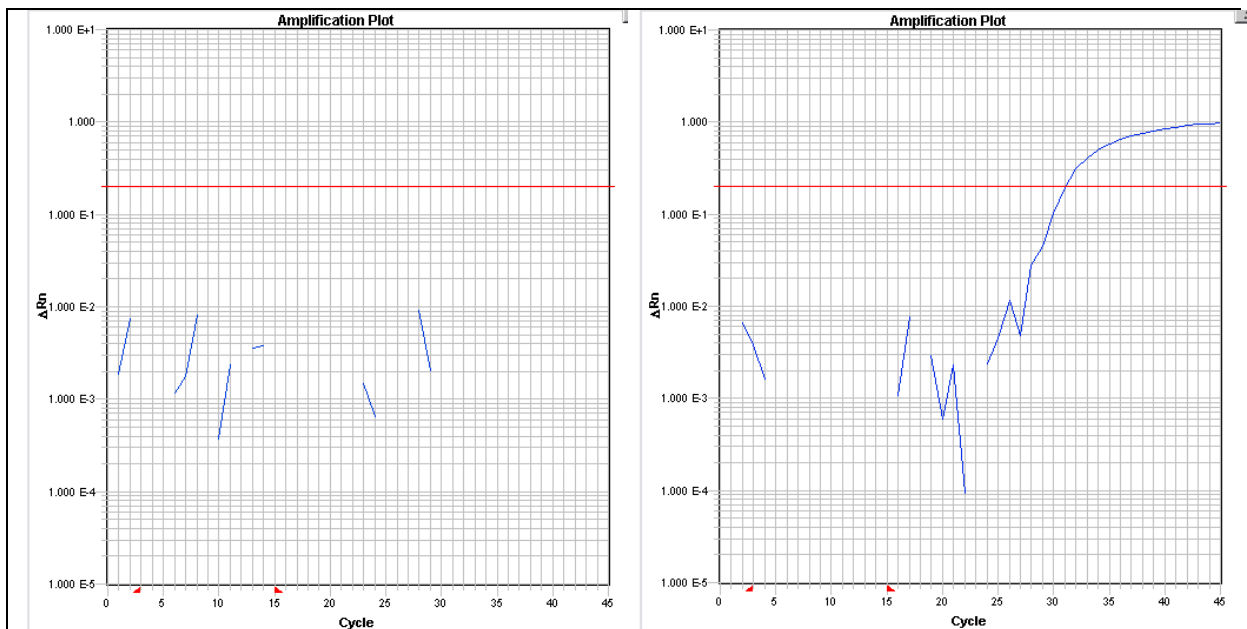


Figure 1 : Courbes d'amplification (obtenue avec un BVDV-Screening) d'un pool confectionné à partir de 20 plasma , tous négatifs

Figure 2 : Courbes d'amplification (obtenue avec un BVDV-Screening) d'un pool confectionné à partir de 20 plasma dont un était positif pour le BVD

3. ESSAI DU KIT FAST-IPI PRODUIT PAR LSI

Ce kit permet de détecter de manière individuelle si un animal est un IPI ou non pour le BVD. En cas d'infection récente, il est toutefois possible qu'un animal en virémie transitoire soit considéré comme IPI.

La figure 3 présente la courbe d'amplification attendue d'un animal non IPI alors que la figure 4 illustre la courbe d'amplification chez un animal IPI. Enfin, la figure 5 montre le profil d'un animal suspecté d'être en virémie transitoire (des analyses ultérieures sont nécessaire pour confirmer ce résultat).

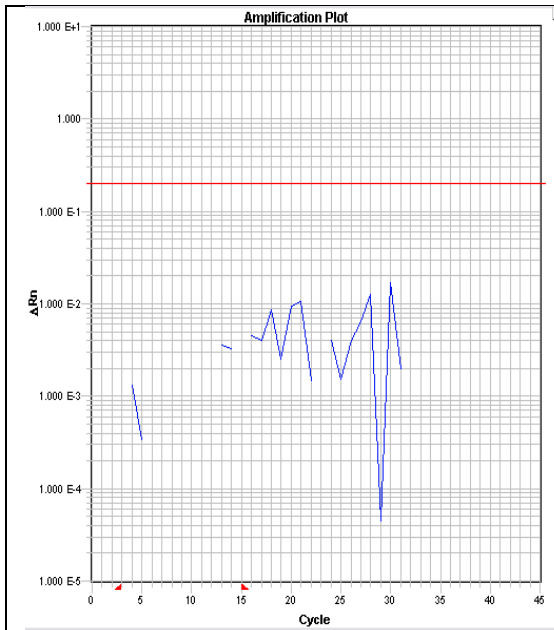


Figure 3 : Courbe d'amplification (obtenue avec une analyse FAST-IPI) d'un échantillon non détecté comme IPI

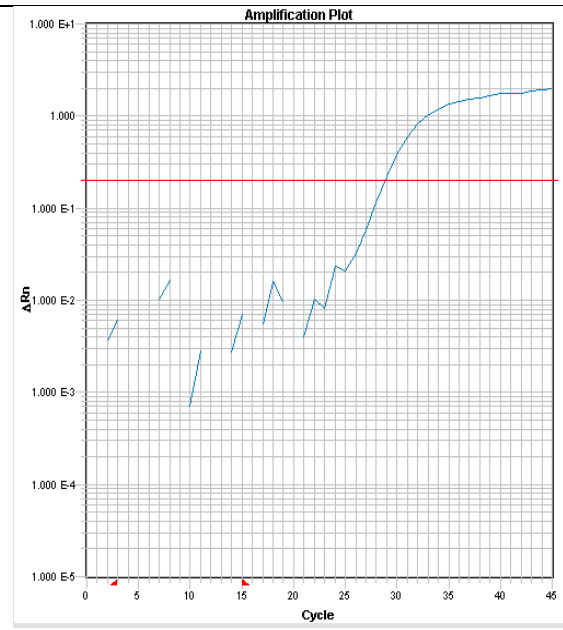


Figure 4 : Courbe d'amplification (obtenue avec une analyse FAST-IPI) d'un échantillon détecté comme IPI

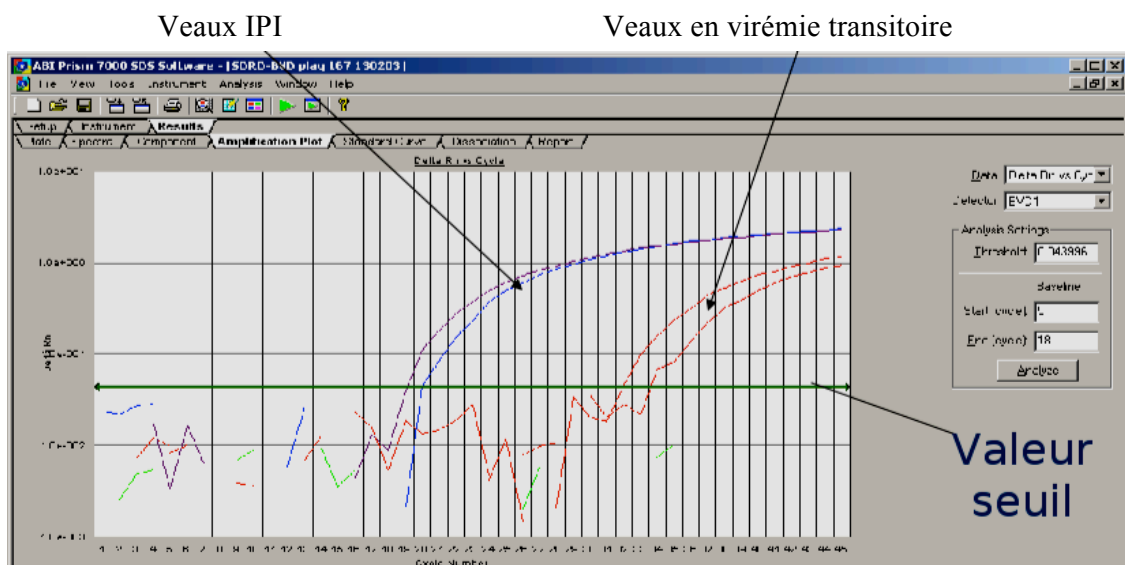


Figure 5 : Différence entre les courbes d'amplification des veaux IPI et des veaux en virémie transitoire

Chapitre 2:

Analyses immunologiques et moléculaires réalisées en Bolivie

1. INTRODUCTION	43
2. PREMIERE ANALYSE ELISA BLOQUANT LES ANTICORPS	43
3. ANALYSES MOLÉCULAIRES SUR LES TROUPEAUX ET LES ANIMAUX SÉRONÉGATIFS	44
3.1 PREMIER TEST QPCR BVDV-SCREENING	44
3.2 DEUXIEME TEST QPCR BVDV-SCREENING	47
3.3 TROISIEME TEST QPCR BVDV-SCREENING	48
3.4 QUATRIEME TEST BVDV-SCREENING	49
3.5 CINQUIEME TEST BVDV-SCREENING	50
3.6 PREMIER TEST FAST-IPI	51
3.7 DEUXIEME TEST FAST-IPI COUPLE A UN TEST BVDV-SCREENING	53
3.8 TROISIEME TEST FAST-IPI	55
3.9 CONCLUSION POUR LES ANALYSES MOLECULAIRES	56
4. ANALYSE IMMUNOLOGIQUES COMPLEMENTAIRES	57
4.1 DETECTION DES ANIMAUX SERONEGATIFS PAR ELISA ANTI-ANTICORPS	57
4.2 DERNIER TEST ELISA ANTI-ANTICORPS	58
4.3 PREMIER TEST ELISA ANTI-ANTIGENE	59
5. ANALYSES RÉALISÉES SUR DES ÉCHANTILLONS DE SANG DE LAMAS	59
5.1 LES LAMAS: UN RESERVOIR POTENTIEL A BVDV	59
5.2 ANALYSES IMMUNOLOGIQUES	60
A) ANALYSE ELISA ANTI-ANTICORPS	60
B) ANALYSE ELISA ANTI-ANTIGENE	61
5.3 ANALYSES MOLECULAIRES	61
A) TEST QPCR BVDV-SCREENING	62
B) TEST QPCR FAST-IPI	62

1. INTRODUCTION

Ce chapitre reprend l'ensemble des résultats des analyses réalisées en Bolivie. Le lecteur remarquera que les analyses moléculaires et immunologiques se suivent et se combinent en fonction des résultats obtenus et en fonction du statut BVDV inconnu de la Bolivie (et principalement de la région de Cochabamba). Les temps importants entre deux analyses et l'ordre parfois incohérent de ces dernières s'expliquent par la difficulté des prises d'échantillons due à une certaine méfiance des éleveurs et par l'accès non immédiat au matériel d'analyse dû à l'hierarchie stricte au sein de PROINPA.

2. PREMIERE ANALYSE ELISA BLOQUANT LES ANTICORPS

Comme déjà expliqué dans la partie matériel et méthode, les analyses ELISA anti-anticorps ont pour but principal est de vérifier la présence du virus dans la région et dans les troupeaux de bovins mais également de détecter les animaux ayant été infectés préalablement par le virus de la diarrhée virale bovine. Dans les 2 fermes analysées (la Granja de Pairumani et la Granja de Don Gabriel), des prélèvements de sang sont réalisés sur un échantillon représentatif de chaque groupe présent dans le troupeau. La détection d'animaux positifs en anticorps permettra de savoir si le virus a été ou est toujours présent dans les exploitations.

Le test est validé par des contrôles positifs et négatifs fournis avec le kit de LSI. Les résultats pour les animaux de la Granja Pairumani sont présentés au tableau 1 et ceux pour les animaux de la Granja de Don Gabriel au tableau 2.

Résultats

Tableau 1: Résultats de la première ELISA anti-anticorps sur les animaux de la Granja de Pairumani (Veaux de < 6 mois et taureaux exclus)

Sérologie	Vaches en production	Vaches tarées multipares	Vaches tarées primipares	Génisses 12 à 24 mois	Veaux de 6 à 12 mois
-	1/36	0/3	0/3	0/5	3/3
+	35/36	3/3	3/3	5/5	0/3
++	0/36	0/3	0/3	0/5	0/3
	Adultes			Veaux (< 2ans)	

Tableau 2: Résultats de la première ELISA anti-anticorps sur les animaux de la Granja de Don Gabriel (Veaux de < 6 mois exclus)

Sérologie	Vaches
-	4/5
+	1/5
++	0/5

Remarque: Les prélèvements sur les taureaux devaient être réalisés en présence du vétérinaire, absent lors des deux premières prises d'échantillon.

Discussion

Tout d'abord, la présence d'animaux à sérologie positive confirme que le virus est présent dans la région de Cochabamba au sein des troupeaux de bovins.

Pour la Granja Pairumani: Vu la présence d'animaux positifs en anticorps, il peut être conclu que le virus est ou a déjà été présent dans cette exploitation. L'entièreté du troupeau doit à présent être testée par le test de qPCR *BVDV-Screening* afin de savoir si des animaux en virémie transitoire ou des animaux IPI sont présents et donc si le virus circule toujours.

Les animaux détectés séropositifs lors de cette analyse ne devront plus être testés car ces derniers ne peuvent plus présenter le virus.

Ces résultats montrent également que presque tous les animaux sont faiblement positifs, ce qui peut signifier que l'infection a eu lieu il y a un certain laps de temps. De plus, comme tous les veaux de l'échantillon du groupe des 6 à 12 mois ont une sérologie négative, il est fort probable que le virus soit passé dans le troupeau il y a plus d'un an.

Pour les animaux à sérologie négative, quelques hypothèses peuvent être émises.

Pour la vache 3450 (vache séronégative), il se peut qu'elle ait été intégrée au troupeau après la circulation du virus ou qu'elle ait été isolée pour une raison ou une autre au moment de l'infection. De même, il y a de fortes chances que les veaux soient nés après le passage du virus d'où l'absence d'anticorps chez eux. Mais il est également possible que ces animaux soient des animaux IPI nés de mères infectées entre le 1^{er} et 4^{ème} mois de gestation. Des analyses ultérieures devront être réalisées afin de savoir s'il s'agit d'animaux IPI ou non.

Pour la Granja de Don Gabriel: Etant donné que sur les 5 animaux testés dans l'exploitation, un animal présente une sérologie positive, il est possible que le virus soit toujours circulant au sein de l'exploitation ou qu'il ait déjà circulé. Des analyses ultérieures sur le reste du troupeau devront donc être réalisées afin de connaître le statut BVDV exacte de cette ferme.

3. ANALYSES MOLÉCULAIRES SUR LES TROUPEAUX ET LES ANIMAUX SÉRONÉGATIFS

Les analyses moléculaires servent à détecter le matériel génétique du virus et permettent donc de savoir si l'animal est infecté ou non. Ensuite en fonction de la charge virale, il est possible de savoir si nous sommes plutôt en présence d'un animal en virémie transitoire ou d'un animal IPI.

3.1 PREMIER TEST QPCR BVDV-SCREENING

Suite à la première analyse ELISA anti-anticorps, nous savons que le virus est ou a été présent dans les 2 exploitations (présence d'animaux séropositifs) et donc un test qPCR *BVDV-Screening* de l'entièreté des deux troupeaux se justifie afin d'identifier les éventuels animaux encore infectés (IPI ou en VT). Tous les animaux du troupeau de la Granja Pairumani seront donc analysés dans ce premier test *BVDV-Screening* par pool de maximum 20 échantillons de plasma (les 50 animaux testés par ELISA précédemment, les taureaux et les veaux de moins de 6 mois exclus) → **Pool D, E, F, G.**

Comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes », un EPC, un NC et un NCS seront également déposés respectivement dans le dernier puits et dans les deux premiers puits.

Résultats

Tableau 3: Résultats du premier BVDV-Screening sur les animaux de la Granja Pairumani (Les 50 premiers animaux (pool A, B, C), les taureaux et les veaux de moins de 6 mois exclus)

	Contrôles			Echantillons			
	NC	NCS	EPC	Pool D	Pool E	Pool F	Pool G
Détecteur BVDV	+	+	+	-	-	-	+
Détecteur IPC	-	+	+	-	-	-	-

Remarque: En Bolivie, des prélèvements ne pouvaient pas se faire sur les veaux de moins de 6 mois. En effet, comme là-bas les animaux ne sont pas vaccinés avant l'âge de 6 mois, l'éleveur considère qu'avant 6 mois un veau est systématiquement et obligatoirement sain et ne peut donc pas être porteur d'un quelconque pathogène.

Discussion

Le problème des contrôles négatifs:

Le NC est négatif en IPC, ce qui est logique car celui-ci n'est pas extrait et donc ne contient pas d'IPC. Toutefois, ce contrôle est positif en BVDV, ce qui est signe d'une contamination. Plusieurs hypothèses peuvent être émises suite à cette contamination:

- une contamination a eu lieu lors du dépôt des échantillons;
- le *MIX BVDV-Screening* (pour la RT-PCR) est contaminé (étant donné que 3 pools sont négatifs en BVDV, cette hypothèse semble peu probable, mais ces pools sont également négatifs en IPC, il se peut que la contamination n'est pas été amplifiée);
- l'eau « PCR » utilisée (ajouté à la place des extraits) est contaminée: pour ce, nous n'ajouterons que du *MIX* dans ce premier puits lors des prochains *BVDV-Screening*.

Le NCS est positif en IPC et en BVDV (Ct similaire au NC), l'extraction cellulaire et l'amplification ont donc fonctionné mais il y a également eu une contamination.

Les deux premières hypothèses citées ci-dessus peuvent être avancées dans le cas présent mais il se peut également:

- qu'une contamination a eu lieu lors de l'extraction, il faudra donc être plus prudent lors des prochaines extractions;
- qu'un des tampons d'extraction utilisé soit contaminé (étant donné que 3 pools sont négatifs en BVDV, cette hypothèse semble peu probable, mais ces pools sont également négatifs en IPC, il se peut que la contamination n'a pas été amplifiée);
- que l'eau *RNase-DNase free* utilisée pour l'extraction soit contaminée (peu probable car eau provenant du kit d'extraction et ouverte pour la première fois lors de la manipulation).

Le contrôle positif

L'EPC est positif en BVDV, au Ct attendu, et avec un profil IPC conforme. L'extraction et l'amplification ont donc eu lieu correctement.

L'analyse des résultats des 4 pools

Leur IPC est négatif, il y a donc eu des problèmes d'extraction et/ou d'amplification. Les résultats BVDV (positifs ou négatifs) de ces pools ne peuvent pas être validés.

Un IPC négatif permet de faire l'hypothèse de la présence d'inhibiteurs de PCR. Les contrôles ayant été extraits d'une autre matrice et ayant un IPC positif attendu, nous pouvons considérer que les inhibiteurs se retrouvent aux niveaux des échantillons et donc certainement pas au niveau du kit PCR.

Les inhibiteurs de PCR présents au niveau des échantillons de sang sont:

- des anticoagulants comme de l'héparine ou de l'EDTA (Morata *et al*, 1998). Mais comme nous n'avons pas utilisé d'héparine et que la concentration d'EDTA est la concentration usuelle, cette hypothèse est peu probable.
- de l'hémoglobine, de la lactoférine (Rådström *et al*, 2001) ou de l'immunoglobuline (Al-Soud *et al*, 2000): la solution d'ARN extrait présentait une légère coloration rosâtre qui pourrait expliquer la présence d'hémoglobine.

Quelles solutions à apporter ?

- Afin de diminuer la présence ou la concentration des inhibiteurs, les solutions des ARN extraits seront diluées, comme le préconise d'autre part le fabricant LSI dans son kit qPCR *BVDV-Screening* (voir encadré ci-dessous).

Solutions proposées par LSI pour des échantillons non validés (IPC négatifs)

1. Diluer l'ARN de l'échantillon non valide comme indiqué: => Dilution de l'ARN au 1/10: 5µl d'ARN « non valide » + 45µl d'eau RNase free.
2. Faire une nouvelle analyse PCR sur 5µl de cette dilution.
3. Si l'ARN « non validé » dilué est positif ou négatif en BVDV avec un résultat IPC positif (Ct IPC < 45), le résultat obtenu est alors validé.
4. Si l'ARN « non validé » dilué est négatif avec un résultat IPC négatif (Ct IPC > ou = 45), le résultat obtenu est toujours non valide. Dans ce cas, renouveler l'extraction de l'échantillon « non validé » en le pré-diluant au 1/10 dans de l'eau *RNase free* avant extraction.

Par ailleurs, ce kit semble fonctionner sur l'EPC et de l'eau, reste à comprendre pourquoi il ne fonctionnerait éventuellement pas sur des échantillons de sang.

A ce stade, nous ne savons donc pas si le problème réside dans le kit d'extraction d'ARN ou dans le kit *BVDV-Screening*.

3.2 DEUXIÈME TEST QPCR BVDV-SCREENING

Dans ce deuxième test de *Screening*, les solutions d'ARN extrait des 4 pools précédents (conservés à -20°C) sont dilués 10x et 100x avec de l'eau *RNase-DNase free* du kit d'extraction et ensuite amplifiés.

Résultats

Tableau 4: Résultats du 2ème *BVDV-Screening* pour les pools D, E, F, G de la Granja Pairumani

	Contrôles			Echantillons							
	NC	NCS	EPC	Pool D		Pool E		Pool F		Pool G	
				10x	100x	10x	100x	10x	100x	10x	100x
Détecteur BVDV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Détecteur IPC	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Discussion

Concernant les résultats obtenus pour les contrôles négatifs:

Les contrôles négatifs présentent des valeurs d'IPC conformes aux spécifications du fabricant (négatif pour le NC et positif pour le NCS). Le NC, contenant à présent uniquement du *MIX*, indique clairement une contamination (importante) au niveau de ce dernier. Ce qui explique pourquoi le NCS est également positif.

Concernant le résultat obtenu pour le contrôle positif:

L'EPC est celui utilisé dans l'analyse précédente et a donc toujours deux résultats (pour l'IPC et pour le BVDV) conformes.

Concernant les résultats obtenus pour les 4 Pools:

L'IPC n'est sorti pour aucun des 4 pools, la dilution des échantillons n'est donc pas suffisante pour lever l'inhibition. Mais la positivité dans presque tous les pools montre que cette fois-ci la contamination a été amplifiée. Les résultats de ces quatre pools restent cependant invalides dus à l'IPC négatif et à la positivité des contrôles négatifs.

Quelles solutions à apporter ?

- A présent, un nouvel aliquot du *MIX* sera ouvert dans une salle différente que celle du *thermocycler* (qui peut être la cause d'une contamination de l'air) et un nouveau NCS sera extrait.
- Etant donné que les échantillons de sang de ces 4 premiers pools sont trop anciens (se conservent 8 jours max à 4°C), ceux-ci seront testés par une deuxième ELISA anti-anticorps (voir point 4 de ce chapitre) afin de détecter les animaux séronégatifs et d'ensuite uniquement concentrer les analyses sur ces derniers.
- Les futurs échantillons à extraire seront dilués avant l'extraction avec du PBS.

3.3 TROISIÈME TEST QPCR BVDV-SCREENING

Des échantillons frais de sang sont utilisés pour réaliser une dilution, avec du PBS, des pools constitués avant l'extraction. Cette analyse est réalisée avec des nouveaux échantillons de sang, à savoir:

- Les échantillons de sang des 8 autres animaux de la Granja de Don Gabriel (veaux de < 6 mois exclus) → **Pool I**
- Les échantillons de sang des 8 taureaux de la Granja Pairumani → **Pool J**

Résultats

Tableau 5: Résultats du 3ème BVDV-Screening pour les Pool I et J

	Contrôles			Echantillons	
	NC	NCS	EPC	Pool I	Pool J
Détecteur BVDV	+	+	+	-	-
Détecteur IPC	-	+	+	-	-

Discussion

Concernant les résultats obtenus pour les contrôles négatifs

Malgré l'utilisation d'un nouveau *MIX*, l'ouverture et le dépôt dans une salle différente de celle où se trouve le *thermocycler*, ces **deux contrôles** sont toujours positifs en BVDV. Nous pouvons donc considérer que ce deuxième aliquot de *MIX* est également contaminé.

Concernant le résultat obtenu pour le contrôle positif

L'**EPC** extrait est celui utilisé dans les analyses précédentes et a donc toujours deux résultats (pour l'IPC et pour le BVDV) conformes.

Concernant les résultats obtenus pour les 2 pools

Ayant toujours un IPC négatif, il est certain que l'extraction ne s'est pas déroulée correctement. De plus comme ils sont négatifs en BVDV, et cela malgré une contamination quasi certaine du *MIX*, on peut postuler que l'amplification a également échoué. Ces résultats sont, comme pour les pools précédents, considérés comme invalides.

Les solutions apportées en réponse aux résultats acquis sont:

- Pour les deux contrôles négatifs, un troisième et nouvel aliquot du *MIX* sera testé en continuant à l'ouvrir dans une pièce avec des risques de contamination minimes;
- Pour le NCS, afin de voir s'il y a un problème avec l'eau *RNase-DNase free* du kit Quiagen utilisée, un NCS sera extrait à partir de 50µl de cette eau et un autre à partir de 50µl du PBS lors de la prochaine extraction;
- Comme pour les pools précédents, une analyse ELISA anti-anticorps des échantillons de ces 2 pools (à partir du plasma conservé à -20°C) sera réalisée (voir point 4.3 de ce chapitre). Ensuite, uniquement les animaux à sérologie négative seront encore analysés;
- Etant donné que nous n'avons plus d'échantillons de sang frais, nous allons également tenter une extraction à partir des plasmas des échantillons de ces 6 pools (D, E, F, G, I, J) et d'un

nouveau pool (pool H) de 8 échantillons de la Granja Pairumani (vaches hors de la ferme lors de la prise précédente d'échantillon);

- Enfin, la quantité d'IPC ajoutée lors de l'extraction de chaque pool sera doublée, afin de mieux comprendre l'importance de l'inhibition.

3.4 QUATRIÈME TEST BVDV-SCREENING

Dans ce quatrième test de *Screening*, une extraction d'ARN à partir de pools de plasma (conservés à -20°C) sera tentée avec le kit d'extraction Quiagen pour échantillons cellulaires.

Seront donc analysés:

- Tous les animaux de la Granja Pairumani, à savoir les **pools D, E, F, G, H, J** (les 50 premiers à sérologie connue et les veaux de < de 6 mois exclus);
- Tous les animaux de la Granja de Don Gabriel, à savoir le **pool I** (les 5 premiers animaux à sérologie connue et veaux de < de 6 mois exclus).

Pour rappel, deux NCS seront extraits, un à partir d'eau *RNase-DNase free* du kit d'extraction (NCS1), un autre à partir de PBS (NCS2) et la quantité d'IPC est doublée.

Résultats

Tableau 6: Résultats du 4ème *BVDV-Screening* pour les pools D, E, F, G, H, I, J

	Contrôles				Echantillons						
	NC	NCS1	NCS2	EPC	Pool D	Pool E	Pool F	Pool G	Pool H	Pool I	Pool J
Détecteur BVDV	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Détecteur IPC	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

*Le Pool D est faiblement positif en IPC (33 Ct les autres étant à 28 Ct)

Discussion

Concernant les résultats obtenus pour les contrôles négatifs

Les **trois contrôles négatifs** restent positifs en BVDV, ce qui continue à faire penser à une contamination du kit (probablement due à une contamination du laboratoire).

Il est à présent certain qu'il ne s'agit pas d'un problème au niveau de l'eau *RNase-DNase free* du kit Quiagen étant donné que les résultats des deux NCS sont semblables (tout deux sont positifs en BVDV).

Concernant le résultat obtenu pour le contrôle positif

L'**EPC** extrait est celui utilisé dans les analyses précédentes et a donc toujours deux résultats (pour l'IPC et pour le BVDV) conformes.

Concernant les résultats obtenus pour les pools

Malgré que le **pool D** présente un IPC faiblement positif, son résultat positif en BVDV ne peut être validé vu la présence d'une contamination observable au niveau des contrôles négatifs.

Le **pool F** est le seul pool à ne pas avoir une valeur de l'IPC conforme et celui-ci sort également négatif en BVDV. Ce pool a pourtant tout en commun avec le pool G (même date de prise d'échantillon, même date de récupération du plasma et évidemment même date d'extraction et de PCR). Dans le cas présent, on peut formuler l'hypothèse que l'amplification n'a pas fonctionné.

Les **pools E, G, H, I, J** ont un bon IPC mais leur positivité en BVDV ne peut être validée vu la contamination détectée.

Par ces exemples, nous voyons que quand l'IPC ne sort pas (pool F), une contamination peut ne pas être observée (négatif en BVDV).

Quelles solutions à apporter ?

- Afin de valider ces résultats, nous tenterons de faire un test *Screening* de ces pools avec le kit *FAST-IPi* (apparemment déjà tenté à PROINPA auparavant) (voir plus loin point 3.6 Premier test *FAST-IPi*);
- Le kit *BVDV-Screening* sera testé une dernière fois avec de l'ARN extrait à partir d'échantillons de lait (point 3.5.).

3.5 CINQUIEME TEST BVDV-SCREENING

Un dernier test *BVD-Screening* est réalisé à partir d'ARN extrait sur des échantillons de lait de la vache 3450 et de la vache 3546 (sérologies négatives) de la Granja Pairumani. Le désavantage de travailler sur du lait est que l'animal peut présenter le virus mais ne pas l'avoir encore libéré dans le lait, ce qui fausserait le diagnostic. Cette analyse servira donc uniquement à essayer d'avoir plus d'informations sur les problèmes rencontrés lors des analyses moléculaires.

Résultats

Tableau 7: Résultats du 5ème *BVDV-Screening* pour les vaches 3546 et 3450

	Contrôles			Echantillons	
	NC	NCS	EPC	Vache 3546	Vache 3450
Détecteur BVDV	+	+	+	+	+
Détecteur IPC	-	+	+	-	+

Discussion

Concernant les résultats obtenus pour les contrôles négatifs

L'IPC ne semble toujours pas poser de problèmes pour ces **deux contrôles** mais une fois de plus ils sont positifs en BVDV, le quatrième *MIX* semble également contaminé.

Concernant le résultat obtenu pour le contrôle positif

L'**EPC** extrait est celui utilisé dans les analyses précédentes et a donc toujours deux résultats (pour l'IPC et pour le BVDV) conformes.

Concernant les résultats obtenus pour les deux échantillons

L'IPC est passé pour l'un mais pas pour l'autre, les **deux échantillons** sont détectés positifs en BVDV, résultat qui ne peut être validé vu la présence d'une contamination.

Etant donné que le kit d'extraction semble avoir fonctionné plusieurs fois (e.a. pour le NCS et l'EPC), on peut raisonnablement imaginer que le problème se situe principalement au niveau du kit d'amplification. En effet, les courbes d'amplification sont parfois conformes et représentent les résultats attendus (e.a. pour l'EPC) et parfois totalement aberrantes, ce qui fait donc penser à un kit endommagé. Ce qui est tout à fait probable, vu le nombre de congélations et décongélations important qu'il a subi lors du voyage Belgique-Bolivie (ayant duré 10 jours) malgré toutes les précautions prises.

En conclusion, il a été proposé d'essayer de confectionner un kit pouvant se conserver à température ambiante, ayant moins de risque d'être endommagé lors du voyage. La préparation de ce kit est décrite dans le chapitre 4 de cette partie « Résultats et Discussions ».

3.6 PREMIER TEST FAST-IPI

L'utilisation de ce type d'analyse de qPCR *FAST-IPI* a pour fonction de répondre à deux objectifs:

- Premièrement, nous allons tenter d'amplifier les 7 pools d'ARN extrait à partir de plasmas (pool D, E, F, G, H, I, J), afin de comparer les résultats avec ceux obtenus lors du quatrième test *BVDV-Screening*;
- Deuxièmement, cette analyse permettra de savoir si les animaux détectés séronégatifs lors de la première analyse ELISA anti-anticorps, à savoir la vache 3450 et les 3 veaux, sont des animaux IPI ou pas.

Pour rappel, lors d'une analyse *FAST-IPI* aucune extraction n'est réalisée. Enfin, ce kit a été utilisé avec succès plusieurs fois au sein de PROINPA.

Résultats

Tableau 8: Résultats du premier test FAST-IPI pour les pools D, E, F, G, H, I, J

	Contrôles			Echantillons en pools						
	NC	NCS1	EPC	Pool D	Pool E	Pool F	Pool G	Pool H	Pool I	Pool J
Détecteur BVDV	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Détecteur IPC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 9: Résultats du premier test FAST-IPI pour la vache 3450 et les veaux 3690, 3701 et 3704 (animaux détectés séronégatifs lors de la première ELISA anti-anticorps)

	Echantillons individuels			
	Vache 3450	Veau 3690	Veau 3701	Veau 3704
Détecteur BVDV	-	-	-	-
Détecteur IPC	-	-	-	-

Discussion

Concernant les résultats obtenus pour les contrôles négatifs

Le *FASTMIX* ne semble pas être contaminé vu que ces **deux contrôles** sont négatifs en BVDV. Mais cette fois-ci, l'IPC semble poser problème car il n'est pas sorti pour le NCS.

Concernant le résultat obtenu pour le contrôle positif

L'**EPC** non plus ne présente pas d'IPC, d'où l'impression que l'IPC de ce kit (l'IPC est inclus au niveau du *FASTBUFFER*) est altéré.

Concernant les résultats obtenus pour les pools

L'IPC n'étant sorti dans aucun puits, ce dernier semble être le problème principal.

Toutefois, le fait d'utiliser le kit *FAST-IPi* directement sur les pools de plasma (comme cela ce fait en individuel) peut avoir affecté l'analyse réalisée. Une extraction préalable de l'ARN des pools via un kit *Quiagen* et ensuite l'utilisation du kit *FAST-IPi* aurait peut-être été plus adéquate. Ceci peut également expliquer pourquoi les puits 3 à 10 (D, E, F, G, H, I, J, K) ont échoué.

Concernant les résultats obtenus pour les échantillons individuels

Finalement, les **échantillons individuels** présentent aussi un IPC négatif. Les résultats BVDV obtenus pour ces échantillons ne peuvent donc être validés.

Quelques hypothèses peuvent être formulées concernant l'IPC:

- soit le problème est lié au fait que la date d'expiration du kit s'approchait;
- soit le problème résulte du fait que toutes les concentrations des réactifs ont été diminuées par 2. Cette « stratégie » est réalisé en routine chez PROINPA afin de doubler la capacité du kit et donc le coût de l'analyse, étant donné que nous étions proches de la date d'expiration du kit, il est possible que l'efficacité de cette « stratégie » a disparu;
- soit l'IPC (incorporé dans le *FASTBUFFER*) ayant été congelé et décongelé plusieurs fois au préalable, a été endommagé.

Quelles solutions à apporter ?

- Vu les nombreux problèmes rencontrés jusqu'à présent lors des analyses moléculaires, plusieurs choses seront tentées et détaillées lors de la deuxième analyse *FAST-IPi* couplée à un *BVDV-Screening* (voir point suivant).

3.7 DEUXIÈME TEST FAST-IPI COUPLÉ À UN TEST BVDV-SCREENING

Afin de contrôler le bon fonctionnement de l'appareil et des kits, une PCR en temps réel avec différents types d'échantillons est réalisée.

Se trouvent donc, dans le puits :

1. un contrôle négatif (NC): 12,5µl de *FASTMIX* ;
2. un contrôle négatif du buffer (NCB): 10µl de *FASTMIX* + 2,5µl de *FASTBUFFER*;

Les résultats de ces 2 premiers puits nous permettrons peut-être de savoir si le problème réside au niveau du kit *FAST-IPI*.

3. **L'ARN d'un échantillon détecté précédemment comme positif** à PROINPA avec le même kit *FAST-IPI* (M09Q) devrait nous permettre de déterminer si le kit *FAST-IPI* fonctionne en individuel et a toujours la même efficacité que celle observée précédemment à PROINPA;
4. Un **pool contenant l'échantillon détecté positif** (19 négatifs et 1 positif) par PROINPA (Mp09Q) afin de s'assurer que le kit *FAST-IPI* fonctionne toujours en pools
5. Le **plasma de la vache 3450** (MsiO) afin de tester les performances du kit *FAST-IPI* sur un de nos échantillons suspecté d'être positif ;
6. **L'ARN du Pool I** (animaux de la Granja de Don Gabriel) extrait à partir de plasma (MpL10Q) afin de voir si le kit *FAST-IPI* fonctionne sur des pools dont l'ARN a été extrait à partir d'échantillons de plasma;
7. **L'ARN du Pool D** (18 vaches de la Granja Pairumani à sérologie positive) (MpO10Q) afin de voir si le kit fonctionne sur des pools dont l'ARN a été extrait d'échantillons de sang complet;
8. **ARN du Pool D dilué 10x** (MpOdd10Q) afin de voir si le kit fonctionne mieux sur de l'ARN dilué;
9. **L'EPC du kit FAST-IPI** (EPC) comme contrôle positif externe;
10. Un **NCS**: 12,5µl du MIX du kit BVDV screening (Mi09Q) afin de voir si le kit *BVDV-Screening* fonctionne et contrôler si le 4ème MIX n'est pas contaminé;
11. Un **pool de 20 ARN** extraits à partir d'échantillons de sang et renfermant l'échantillon précédemment détecté comme positif par PROINPA (19 négatifs et 1 positif) (Mp09Q) (même pool que dans le puits 4 mais amplifié par *BVDV-Screening*). Cet échantillon a pour objectif de vérifier si le kit *BVDV-Screening* fonctionne sur un pool positif et de comparer le résultat obtenu avec le kit *FAST-IPI* pour ce pool (puits A4).

Résultats

Tableau 10: Résultats du deuxième test FAST-IPI couplé à un test BVDV-Screening

	Détecteur	Résultat obtenu	Résultat attendu	Commentaire
NC	BVDV	-	-	Ok
	IPC	-	-	
NCB	BVDV	-	-	L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
M09Q	BVDV	+	+	L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
Mp09Q	BVDV	-	+	Le pool n'est pas détecté positif L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
MsiO	BVDV	-	?	L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
MpL10Q	BVDV	-	?	L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
MpO10Q	BVDV	-	? (-)	Pool d'animaux avec une sérologie négative, devrait donc être détecté négatif, L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
MpOdd10Q	BVDV	-	? (-)	Tous les animaux ont une sérologie négative devrait donc être détecté négatif, L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
EPC	BVDV	+	+	L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
NCS	BVDV	+	-	Contamination car positif en BVDV L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	
Mp09Q	BVDV	-	+	Le pool n'est pas détecté positif L'IPC n'est pas conforme
	IPC	-	+	

Discussion

Concernant l'IPC: dans aucun puits l'IPC n'est conforme et positif, comme mis en évidence lors de l'analyse précédente, ce *FASTBUFFER* semble peu efficace.

Concernant la détection du BVDV

Le kit *FAST-IPI* a fonctionné pour un **échantillon individuel** (M09Q) en le détectant positif comme précédemment chez PROINPA. Mais par contre, il n'a pas détecté le **pool** (Mp09Q) contenant cet échantillon positif.

Nos échantillons et pools sont tous négatifs en BVDV, ce qui est probablement le cas, même si la présence d'un IPC négatif ne nous permet pas de conclure dans ce sens.

L'EPC est positif en BVDV, avec une courbe semblable à celle déjà sortie précédemment.

Finalement, le **quatrième MIX** du kit *BVDV-Screening* semble être contaminé également mais de manière moins importante qu'observé précédemment (Ct = 35,57 or avant nous avons un Ct

entre 28 et 32). Et le *Screening* ne semble toujours pas fonctionner (le dernier puits contenant un **pool** avec un échantillon positif n'a pas été détecté).

Face à ce type de résultats plusieurs éléments sont à mettre en évidence:

- Etant donné que le kit *BVDV-Screening* semble être endommagé mais que son IPC est toujours très bien sorti pour les contrôles, nous allons essayer de combiner l'IPC du *BVDV-Screening* avec le *FASTMIX* du kit *FAST-IPI*. En effet, le *FASTBUFFER* n'étant qu'un IPC très dilué (avec du colorant), il suffira de réaliser la même dilution avec l'IPC du kit *BVDV-Screening* pour reconstituer un *FASTBUFFER* qui normalement devrait être fonctionnel;
- Un nouvel aliquot de *FASTBUFFER* sera également testé;
- Nous pouvons penser que pour les échantillons individuels le résultat BVDV est correct, malgré l'absence d'IPC. Il semblerait donc que la vache 3450 n'est pas un animal IPI. Une analyse de son antigénémie réalisée ultérieurement pourra confirmer ce résultat (voir point 4.3 de ce chapitre).

3.8 TROISIÈME TEST FAST-IPI

Comme expliqué ci-dessus, cette dernière analyse moléculaire aura pour but de tester la combinaison de l'IPC du kit *BVDV-Screening* avec le *FASTMIX* du kit *FAST-IPI*. Un nouvel aliquot de *FASTBUFFER* sera également tester.

Seront donc testés:

- Un **NC** composé de 12,5µl du *FASTMIX*;
- Un **NCB-FAST** (2,5µl de *FASTBUFFER* (nouveau tube) + 10µl de *FASTMIX*);
- Un **NCB-Scré** (2,5µl de l'IPC du kit *BVDV-Screening* dilué 5 fois + 10µl de *FASTMIX* du kit *FAST-IPI*);
- **M1-SCRE**: 1 échantillon détecté comme positif en octobre 2009 (à PROINPA avec ce même kit *FAST-IPI*), l'ARN dilué avec de l'IPC du kit *BVDV-Screening* dilué et du *FASTMIX*;
- Un **EPC-SCRE**: celui que nous avons extrait le 25 mars et qui à toujours bien fonctionné, avec l'IPC dilué et le *FASTMIX*.

Remarque: Afin de voir s'il n'y a pas de problème avec les détecteurs placés au-dessus des puits les plus souvent utilisés, nous avons placé les échantillons à un autre endroit, c'est-à-dire dans les puits de la quatrième ligne (ligne D).

Résultats

Tableau 11: Résultats du dernier test FAST-IPI (combinaison des deux kits)

	Contrôles				
	NC	NCB-FAST	NCB-SCRE	M1-SCRE	EPC-SCRE
Détecteur BVDV	-	-	-	+	-
Détecteur IPC	-	-	-	+	-

Discussion

Concernant les contrôles négatifs

Le NC étant négatif pour le BVDV, nous sommes certains qu'il n'y a aucune contamination au niveau du *FASTMIX*. Les **deux NCB** devraient être positifs en IPC mais nos résultats prouvent que changer de *FASTBUFFER* ou le remplacer par de l'IPC dilué n'aide pas l'IPC à sortir. La combinaison des deux kits ne semble donc pas fonctionner.

Concernant le contrôle positif

Notre **EPC** qui est toujours bien sorti, est cette fois-ci négatif en IPC et en BVDV, il est possible que cela soit dû au fait qu'il ait subi trop de cycles de congélation et décongélation. En effet, l'EPC extrait n'avait pas été aliquoté.

Concernant l'échantillon

L'**échantillon** sort positif en BVDV et en IPC mais les courbes d'amplification (courbes jaunes indiquées par un cercle rouge) sont anormales et ne sont donc pas considérées comme valides (voir figure 6).

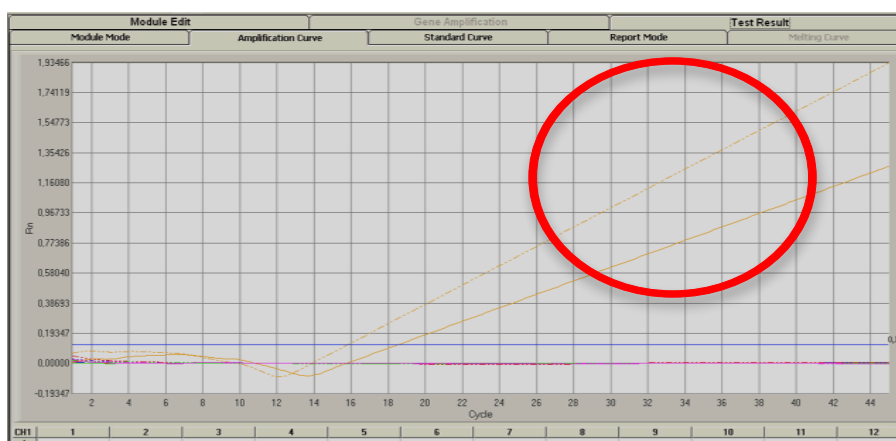


Figure 6: Courbes d'amplification du 3ème test FAST-IPI

3.9 CONCLUSION POUR LES ANALYSES MOLÉCULAIRES

Aucune analyse moléculaire n'a (parfaitement) fonctionné en Bolivie. Suite à nos différents essais, et après en avoir longuement discuté avec le fabricant, la cause la plus probable de l'inefficacité du kit PCR doit être mise à l'actif d'une dégradation du kit en raison d'un délai trop long (barrières douanières obligent) entre la Belgique et la Bolivie. Une solution envisageable, comme déjà évoqué précédemment, est de développer un kit avec la totalité ou l'essentiel des réactifs lyophilisés afin de disposer de conditions de conservation moins strictes. La mise en œuvre d'un tel kit se fera en Belgique et est détaillée dans le chapitre 4 de cette partie « Résultats et Discussion ».

4. ANALYSE IMMUNOLOGIQUES COMPLÉMENTAIRES

Vu le non fonctionnement des analyses moléculaires et notre engagement envers les éleveurs, ces analyses immunologiques serviront à rassembler un maximum d'informations concernant le statut BVDV des deux exploitations.

L'analyse ELISA anti-anticorps permettra de détecter tous les animaux à sérologie négative dans les deux exploitations. Ensuite une ELISA anti-antigène sur ces animaux sera réalisée afin de détecter les éventuels animaux portant le virus. Les animaux à antigénémie positive seront retestés avec une analyse ELISA anti-antigène, 3 semaines plus tard, afin de détecter l'éventuelle présence d'animaux IPI.

4.1 DÉTECTION DES ANIMAUX SERONEGATIFS PAR ELISA ANTI-ANTICORPS

Les animaux à sérologie négative pouvant être des animaux IPI, cette deuxième analyse ELISA servira à les détecter dans les deux troupeaux et d'ensuite à uniquement se concentrer sur ceux-ci. Seront donc analysés:

- Tous les animaux de la Granja Pairumani (taureaux inclus, les 50 animaux à sérologie connue et les veaux de moins de 12 mois exclus)

Remarque: Vu que les veaux de 6 à 12 mois n'ont pas l'habitude d'être manipulés, la prise de sang se faisait dans la jugulaire et avec des difficultés pour maintenir le veau au sol, l'éleveur considéra ceci trop éprouvant pour le veau nous n'avons donc pas pu reprendre des échantillons dans ce groupe, malgré notre insistance.

- Tous les animaux de la Granja de Don Gabriel (les 5 animaux à sérologie connue et les veaux de moins de 6 mois exclus)

Résultats

Tableau 12 : Résultats de la deuxième ELISA anti-anticorps pour les animaux des deux exploitations

Sérologie	Granja Pairumani		Granja de Don Gabriel
	Vaches & veaux	Taureaux	Vaches
-	1/84	2/8	4/8
+	25/84	6/8	2/8
++	58/84	0/8	2/8

Discussion

La Granja Pairumani:

La plupart des vaches sont fortement positives, contrairement à ce qui avait été vu lors de la première analyse ELISA. On peut donc suspecter que la circulation virale est plus récente que prévue. Par cette seconde analyse ELISA, on constate qu'il est inutile de réaliser des analyses supplémentaires sur les animaux à sérologie positive.

Uniquement la **vache 3546** apparaît comme négative en anticorps. Pour cette dernière, les hypothèses préalablement émises pour la vache 3450 sont toujours d'actualité, à savoir, soit cette vache était isolée pour une raison ou une autre lors de la circulation virale, soit cette vache est un

animal IPI. Elle devra donc être soumise à des analyses ultérieures afin de savoir s'il s'agit d'un animal IPI ou non (voir point 4.3 de ce chapitre).

Les **taureaux** sont presque tous positifs en anticorps. Pour les deux taureaux séronégatifs, il est probable qu'ils soient arrivés après le passage de virus ou n'aient pas été infectés en raison de leur écartement du troupeau. Il se peut aussi qu'ils s'agissent d'animaux IPI. Des analyses ultérieures seront également réalisées afin de déterminer le statut BVD exact de ces animaux. (voir la remarque au point 4.3 de ce chapitre).

La Granja Don Gabriel

La présence d'animaux séronégatifs (8) et d'animaux séropositifs (5) peut faire penser à une présence virale. Les animaux à sérologie négative devront donc être analysés par après afin de savoir s'il s'agit d'animaux IPI ou non. La sérologie des animaux négatifs en anticorps peut être vérifiée 3 semaines après le prélèvement de ces échantillons afin d'observer une éventuelle évolution et donc une éventuelle circulation virale lors de cette période (voir point suivant).

4.2 DERNIER TEST ELISA ANTI-ANTICORPS

Ce dernier test ELISA anti-anticorps aura pour but d'observer des éventuels changements ou d'évolution dans la sérologie des animaux séronégatifs de la Granja de Don Gabriel, 3 semaines après la première prise d'échantillons (prise d'échantillon: 21/4/2010).

Remarque: Une vache (Kjola con cadena) fut détectée positive en anticorps, mais selon la propriétaire de la ferme, cette vache aurait eu des problèmes d'avortement, nous avons donc décidé de la retester.

Résultats

Tableau 13: Résultats du dernier test ELISA anti-anticorps pour les animaux séronégatifs

Sérologie	Les 8 animaux détectés séronégatifs 4 semaines avant	Kjola con cadena
-	8/8	0/1
+	0/8	1/1
++	0/8	0/1

Discussion

Etant donné que la sérologie de ces animaux ne semble pas avoir évolué, nous pouvons supposer que le virus n'est plus présent dans le troupeau et qu'il y a donc peu de chance que ce troupeau contienne des animaux IPI. Afin de confirmer l'absence d'une circulation virale et d'éventuels animaux IPI, des analyses ultérieures sont nécessaires (voir point 4.3 de ce chapitre).

La vache Kjola con cadena a toujours une sérologie positive, les problèmes d'avortement ont peut-être eu lieu lors de la circulation virale du BVDV.

4.3 PREMIER TEST ELISA ANTI-ANTIGENE

Cet ELISA aura pour but de détecter la présence d'antigènes chez les animaux à sérologie négative. L'absence d'antigène chez un animal permettra d'exclure l'hypothèse d'un animal IPI. Cet ELISA se réalisant sur du sang frais, de nouveaux échantillons de sang ont été prélevés sur les animaux à sérologie négative.

Seront donc analysés:

- Dans la Granja de Pairumani: échantillons de sang des 2 vaches à sérologie négative (vache 3546 et vache 3450)
- Dans la Granja de Don Gabriel: échantillons des 8 vaches à sérologie négative et de la vache Kjola con cadena qui a eu des problèmes d'avortement.

Remarque: Etant donné que la prise d'échantillons sur les veaux et les taureaux est assez difficile, nous n'avons pas été autorisés à réaliser une nouvelle prise d'échantillons sur ces animaux. Les plasmas des 3 veaux et des 2 taureaux séronégatifs de la Granja Pairumani, récoltés auparavant et conservés à -20°C, seront donc testés en Belgique par une analyse moléculaire FAST-IPI (voir chapitre 3 de cette partie « Résultats et Discussion »).

Résultats

Tableau 14: Résultats du premier test ELISA capteur d'antigènes pour les animaux séronégatifs

Antigénémie	Animaux séronégatifs de la Granja Pairumani	Animaux séronégatifs de la Granja de Don Gabriel	Kjola con cadena (vache avec des problèmes d'avortement)
-	2/2	8/8	1/1
+	0/2	0/8	0/1

Discussion

Granja de Pairumani: les 2 vaches sont négatives en antigènes, ce qui signifie qu'elles ne sont pas IPI. L'historique de ces deux vaches pourra nous dire pourquoi celles-ci n'ont pas rencontré le virus (isolation, arrivée plus tardive dans la ferme,...).

Granja de Don Gabriel: les vaches de la Granja de Don Gabriel ont également une antigénémie négative. Nous ne sommes donc pas en présence d'animaux IPI.

5. ANALYSES RÉALISÉES SUR DES ÉCHANTILLONS DE SANG DE LAMAS

5.1 LES LAMAS: UN RESERVOIR POTENTIEL A BVDV

Le virus de la diarrhée virale bovine a été identifié depuis plus de 10 ans maintenant chez les lamas et alpacas (Fowler, 1998; Tibary *et al*, 1997). Les symptômes sont semblables à ceux observés chez les bovins à savoir: perte de poids, diarrhées et avortements. Au cours de la gestation, une transmission verticale peut également avoir lieu, donnant naissance à des animaux IPI si l'infection du fœtus a lieu entre le 58ème et le 125ème jour de gestation (Carman *et al*, 2005; Belknap *et al*, 2000)). La détection du virus (et des animaux IPI) au sein de cette espèce est donc tout aussi importante que chez les bovins, et surtout dans les pays Andins où les lamas et les alpacas sont des animaux d'élevage communs.

5.2 ANALYSES IMMUNOLOGIQUES

Les camélidés, famille à laquelle appartiennent les lamas, ont des anticorps à structure unique. Ce qui signifie que les chaînes légères sont absentes, les anticorps sont donc uniquement constitués de chaînes lourdes. La figure 7 montre la différence entre la structure conventionnelle d'un anticorps et la structure d'un anticorps de lama.

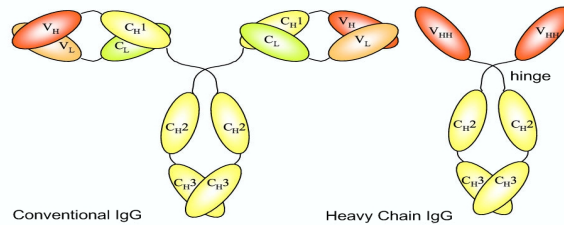


Figure 7: Représentation schématique de la structure conventionnelle d'un IgG (Immunoglobuline G) avec une chaîne lourde et une chaîne légère (à Gauche) et un anticorps à structure unique rencontrés chez les camélidés (Trilling, 2009).

Lors de la détection d'anticorps contre le BVDV avec le kit «ELISA BVD p80 Blocking one step» fabriqué par LSI et dédié au bovin, la plaque est sensibilisée avec l'antigène de la protéine p80 du BVD. Si les sites de liaison des anticorps de lamas sont plus proches (vu l'absence des chaînes légères), la liaison de ces anticorps à cet antigène se déroule exactement de la même manière qu'avec les anticorps produits par les bovins. De plus comme il s'agit d'un ELISA de compétition, l'anticorps marqué ne se fixe pas sur l'anticorps anti-BVDV produit par le lama et dès lors la structure est sans importance dans cette réaction immunologique (Beaudeau *et al*, 2001).

Concernant les analyses ELISA anti-antigènes aucun problème ne se pose car ce sont les antigènes du virus qui sont détectés indépendamment de la structure des anticorps présents.

A) Analyse ELISA anti-anticorps

Cette réalisation du projet a pour but principal de déterminer si la détection d'anticorps via le kit ELISA disponible est performante sur du sang de lamas. Si cette analyse fonctionne, elle permettra également de savoir si une infection préalable a eu lieu dans les deux troupeaux de lamas étudiés.

Seront donc analysés:

- Les échantillons de plasma de lamas provenant de deux troupeaux de la région de la communauté de Quipaquipani (La Paz) → **Pool K** (10 échantillons)

Résultats

Tableau 15: Résultats du test ELISA anti-anticorps pour les deux troupeaux de lamas

Sérologie	Troupeau nr°1	Troupeau nr°2
-	7/8	2/2
+	1/8	0/2
++	0/8	0/2

Discussion

Cette analyse montre que ce test semble fonctionner sur les lamas. Pepina est le seul lama à avoir une sérologie positive. Ce qui est intéressant c'est qu'elle se trouve être la mère de Teodora qui était le lama dont l'état sanitaire général était le plus déplorable lors de la prise d'échantillon. Selon l'éleveur, cet animal présentait un déficit de croissance par rapport aux autres animaux du troupeau. Il y a peu de chance que ce dernier soit un IPI car il a plus d'un an et demi et peu d'animaux dans le troupeau semblent avoir une sérologie positive (10 lamas sur les 30 animaux ont été testés et seulement 1 ressort avec une sérologie positive). Pepina est le lama le plus vieux du troupeau avec Amalia (séronégative). Il est donc possible que le virus ait circulé il y a plusieurs années et qu'il n'est plus présent.

B) Analyse ELISA anti-antigène

Afin de tester un maximum de méthode de détection du BVDV sur cette espèce, une analyse ELISA capteur d'antigène est réalisée sur les échantillons de sang des lamas de Quipaquipani (La Paz).

Seront donc analysés:

- Les échantillons de sang de lamas provenant de deux troupeaux de la communauté de Quipaquipani (La Paz) → **Pool K** (10 échantillons)

Résultats

Tableau 16: Résultats du test ELISA capteur d'antigènes pour les 2 troupeaux de lamas

Antigénémie	Troupeau nr°1	Troupeau nr°2
-	8/8	2/2
+	0/8	0/2

Discussion

Vu que pour cette analyse, tous les animaux ressortent négatifs en antigène, le bon fonctionnement du kit sur des échantillons de sang de lamas est incertain. Nous ne pouvons donc pas conclure avec certitude qu'aucun lama n'est infecté.

Les analyses réalisées sur les lamas ayant pour but principal de voir si les méthodes de détection fonctionnent sur cette espèce et non de faire un diagnostic, uniquement la descendance de Pepina (sérologie positive) et un lama présentant des symptômes seront testés par FAST-IPI de retour en Belgique à savoir: Teodora, Margarita et Raoul.

5.3 ANALYSES MOLÉCULAIRES

Les analyses moléculaires réalisées sur les échantillons de sang et de plasmas de lamas ont été réalisées en parallèle avec celles réalisées sur les prélèvements de bovins. Quelques résultats particuliers et divergents ont été obtenus pour les échantillons provenant de lamas et seront détaillés ci-dessous. Les analyses moléculaires détectent le virus en amplifiant la région 5'UTR du génome viral (voir point 8.3 dans la partie « Matériel et méthode »). Il semblerait que le BVDV des lamas soit uniquement de type 1 (1a ou 1b) (Beaudeau *et al*, 2001; Wentz *et al*, 2003) car aucune séquence commune avec le BVDV de type 2, rencontré chez les bovins, n'a été trouvée chez les lamas. Comme les tests de *BVDV-Screening* et de *FAST-IPI* détectent les types 1

et 2, la réalisation de ces analyses ne devrait poser aucun problème sur des échantillons de sang ou plasma de lamas.

A) Test qPCR BVDV-Screening

Cette analyse a pour but de détecter la présence éventuelle de lamas infectés dans un pool constitué de l'ARN extrait des échantillons de sang de 10 lamas de la communauté de Quipaquipani → **Pool K**

Résultats

Tableau 17: Résultats du test BVDV-Screening pour le pool de lamas (pool K)

	Contrôles			Echantillons
	NC	NCS	EPC	Pool K
Détecteur BVDV	+	+	+	-
Détecteur IPC	-	+	+	-

Remarque: Ces résultats ont été obtenus lors de la 3ème analyse BVDV-Screening

Discussion

Les résultats des contrôles ont déjà été discutés lors de la 3ème analyse BVDV-Screening (voir point 3.3 de ce chapitre).

L'objectif de ce test était de voir s'il fonctionnait également sur du sang de lamas. N'ayant pas fonctionné (ainsi que toutes les autres analyses BVDV-Screening) sur l'ARN extrait à partir de sang de bovins, aucune conclusion ne peut être formulée.

B) Test qPCR FAST-IPI

Cette analyse FAST-IPI est réalisée sur du plasma obtenu à partir des échantillons de sang d'un lama dans chaque exploitation (L1 et L9).

Résultats

Tableau 18 : Résultats du test FAST-IPI sur un lama de chacune des 2 exploitations

	Contrôles			Echantillons	
	NC	NCS1	EPC	L1	L9
Détecteur BVDV	-	-	+	/	/
Détecteur IPC	-	/	/	/	/

Remarque: Ces résultats ont été obtenus lors de la 1ère analyse FAST-IPI (point 3.6)

Discussion

Cette analyse n'a pas du tout fonctionné, principalement en raison d'un problème d'IPC, la discussion des résultats obtenus est présentée au point 3.6 de ce chapitre (Première analyse FAST-IPI).

Aucune conclusion concernant le fonctionnement de cette analyse et de ce kit sur des échantillons de sang de lamas ne peut être tirée.

Toutefois, l'analyse FAST-IPI a été réalisée en Belgique sur les trois lamas suspects et les résultats sont repris dans le chapitre 3 de cette partie « Résultats et Discussions ».

Chapitre 3:

Analyses FAST-IPI supplémentaires réalisées en Belgique

Suite aux problèmes d'analyse moléculaire rencontrés en Bolivie et vu l'impossibilité de reprendre des échantillons de sang complet sur les taureaux, veaux et lamas, le plasma des échantillons collectés sur ces animaux a été isolé afin de pouvoir réaliser des analyses selon la technique du *FAST-IPI* en Belgique.

Vu la séropositivité de quasi la totalité des animaux de l'exploitation de la Granja Pairumani, les 2 taureaux et les 3 veaux de la Granja Pairumani avec une sérologie négative ont donc été testés afin de déterminer s'ils étaient des animaux IPI.

Les plasmas des lamas de la Quipaquipani ont également été analysés selon la technique *FAST-IPI* afin de tester ce kit de détection moléculaire sur ce type d'échantillons.

Résultats

Les résultats obtenus sont repris dans les tableaux ci-dessous et détaillés en annexe.

Tableau 1: Résultats de l'analyse FAST-IPI réalisée en Belgique sur les échantillons de taureaux et de veaux de la Granja Pairumani à sérologie négative

	Contrôles		Echantillons				
	NCS	EPC	Taureau 246	Taureau 250	Veau 3690	Veau 3701	Veau 3704
Détecteur BVDV	-	+	-	-	-	-	-
Détecteur IPC	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 2: Résultats de l'analyse FAST-IPI réalisée en Belgique sur les échantillons de plasma des lamas de la communauté de Quipaquipani présentant des signes subcliniques de la BVD

	Echantillons		
	Théodora	Margarita	Raul
Détecteur BVDV	-	-	-
Détecteur IPC	+	+	+

Discussion

L'analyse des résultats montre que dans nos tests la valeur de l'IPC est conforme à celle recommandée par le fabricant quelque soit l'échantillon analysé. Ceci a pour implication de confirmer notre hypothèse selon laquelle la conformité du kit *FAST-IPI* utilisé en Bolivie pour lequel l'IPC n'était pas amplifié, ne peut être mise en cause puisque dans le cas présent, nous avons utilisé un kit issu du même lot de fabrication. Ceci renforce donc notre hypothèse de dégradation dû aux cycles de congélation et de décongélation.

Le NCS étant négatif en BVDV, aucune contamination n'a eu lieu. L'EPC, sortant positif en BVDV, permet de valider les résultats obtenus avec ce test à savoir; aucun animal ne semble être un animal IPI.

Chapitre 4:

Kit de détection moléculaire du BVDV se conservant à température ambiante

1. INTRODUCTION	64
2. LYOPHILISATION DES DIFFERENTS COMPOSANTS DU KIT	64
3. UTILISATION DES « ILLUSTRATED READY-TO-GO RT-PCR BEADS » DE GE HEALTHCARE	65

1. INTRODUCTION

Dans le chapitre 2 de cette partie Résultats et Discussions, nous avons constaté que les kits *BVDV-Screening* et *FAST-IPI* avaient été endommagés pour les analyses moléculaires. L'hypothèse de dégradation suite aux cycles de congélation et décongélation subis lors du trajet Belgique-Bolivie a été émise, d'où notre volonté de tenter d'élaborer un kit pouvant se conserver à température ambiante.

L'élimination de l'eau dans un produit permettant d'augmenter sa conservation à température ambiante, tout en réduisant le volume (et donc en diminuant les coûts de transport), nous avons d'abord penser à la lyophilisation des composantes du kit *BVDV-Screening*.

La composition et le dosage pour la reconstitution du *BVDV-MIX* du kit *BVDV-Screening* de LSI sont repris au tableau 21 ci-dessous.

Tableau 21 : Composantes du kit BVDV-Screening de LSI et doses pour sa reconstitution afin d'analyser 1, 10, 50 ou 100 échantillon(s)

Composantes	Doses (en µl) des composantes pour				
	1 échantillon	10 échantillons	50 échantillons	100 échantillons	200 échantillons
Master MIX (Taq)	12,5	125	625	1250	2500
Enzyme RT	1	10	50	100	200
Eau RNase free	4,5	45	225	450	900
Séquences BVDV	2	20	100	200	400

2. LYOPHILISATION DES DIFFERENTS COMPOSANTS DU KIT

La lyophilisation s'est faite avec un lyophilisateur à vide (Réf : Thermo Scientific, Savant ISS110, Speed Vac Concentrato FC 400) en positionnement « Medium Rate ».

La resolubilisation, vu les quantités infimes lyophilisées, s'est faite avec le même volume que celui qui avait été lyophilisé. Idéalement, et lors de la lyophilisation de quantités plus importantes, il faudrait peser avant et après la lyophilisation et estimer ainsi la perte d'eau et donc le volume nécessaire pour la remise en solution.

Uniquement de l'EPC a été extrait et amplifié après cet essai.

Résultats

Tableau 22: Résultats pour la lyophilisation et la resolubilisation des composantes du kit BVDV-Screening de LSI lyophilisés

	Master MIX	Enzyme RT	Séquences BVDV	EPC	IPC
Lyophilisation	/	/	20µl ± 45 min	5µl ± 25 min	10µl ± 35 min
Resolubilisation	/	/	20µl d'eau	5µl d'eau	10µl d'eau

Tableau 23: Tests des séquences BVDV lyophilisées avec l'EPC et l'IPC lyophilisés et non lyophilisés

	Valeur du kit sans aucune lyophilisation	Séquences BVDV lyophilisées, Master MIX et RT non lyophilisés		
		EPC et IPC non lyophilisés	EPC lyophilisé IPC non lyophilisé	EPC lyophilisé IPC lyophilisé
Ct BVDV	31,33	35,82	35,40	35,28
Ct IPC	29,49	/ ^(*)	31,96	35,38

() L'IPC utilisé n'avait donné aucun résultat tant avec les séquences BVDV lyophilisées que celles non lyophilisées. Un nouvel IPC a par la suite été utilisé et fonctionnait très bien (voir EPC et IPC) avec les séquences BVDV lyophilisées.*

Discussion

La « lyophilisation » totale du Master MIX et de l'enzyme RT n'a pas pu se faire car a donné lieu à une consistance gélatineuse en raison de la présence de glycérol. En effet, la Taq Polymérase (présente dans le Master MIX) et la Reverse transcriptase (enzyme RT) sont des enzymes qui se conservent à -20°C sans dégradation possible grâce au glycérol dans lequel elles sont contenues. La resolubilisation et l'amplification avec ces enzymes « lyophilisées » n'ont donné aucun résultat concluant. Une solution autre à la lyophilisation sera donc envisagée pour pouvoir conserver ces deux composants à température ambiante.

Les séquences BVDV ont très facilement pu être lyophilisées et donnent des courbes d'amplification conformes, même si la sensibilité pour la détection du BVDV est plus faible (on perd 4 Ct (on passe de 31,33 Ct en non lyophilisé à 35,82 Ct en lyophilisé)).

Ensuite, les séquences BVDV lyophilisées ont été utilisées pour tester l'EPC et l'IPC qui ont également aisément pu être lyophilisés.

La lyophilisation de l'EPC et l'IPC ne semble pas affecter le Ct pour la détection du BVDV car la sensibilité est semblable à celle obtenue précédemment (proche de 35 Ct).

Par contre, on remarque que la lyophilisation de l'IPC fait perdre 6 à 4 Ct au niveau de la détection de l'IPC (on passe de 29,49 Ct et 31,96 Ct en non lyophilisé à 35,38 Ct en lyophilisé).

Ces pertes de sensibilité devront être prises en compte lors du travail en pools et donc lorsque des dilutions d'ARN auront lieu.

3. UTILISATION DES « ILLUSTRATED READY-TO-GO RT-PCR BEADS » DE GE HEALTHCARE

Une méthode alternative à la lyophilisation du Master MIX et de la RT, est l'utilisation des « Illustrated Ready-to-Go RT-PCR Beads » produite par GE Healthcare (2007). Ce MIX, sous forme de bille, contient de la RT, de la Taq et des dNTP et se conserve à température ambiante.

L'idée est donc de combiner ces billes avec les séquences BVDV, l'EPC et l'IPC lyophilisées, afin de tenter l'élaboration d'un kit qui se conserve à température ambiante.

Nous avons réhydraté les billes dans un volume final de 50µl contenant les séquences BVDV, l'ARN à amplifier et de l'eau *RNAse-DNAse free*. Vu que le volume final était doublé (celui de

LSI étant de 25 μ l), la quantité de séquences BVDV l'a également été (4 μ l de séquences BVDV ont été utilisés pour un échantillon au lieu de 2 μ l (voir tableau 1)).

Premièrement, ces billes ont été testées avec un EPC, un IPC et des séquences BVDV non lyophilisées et avec le même cycle que celui utilisé pour le kit *BVDV-Screening*. (voir partie 3: Matériel et Méthodes).

Résultats

Nous n'avons pas obtenu de réelle amplification. Le Multicomponent Plot (repris à la figure 8) permet d'observer la fluorescence brut (sans référence passive) pour le BVDV et l'IPC.

Les figures 10 et 11 permettent de comparer les fluorescences normalement obtenues respectivement pour un EPC et pour un NCS. La figure 9 reprend la légende pour les courbes de fluorescences brutes des différents détecteurs observées aux figures 8, 10 et 11.

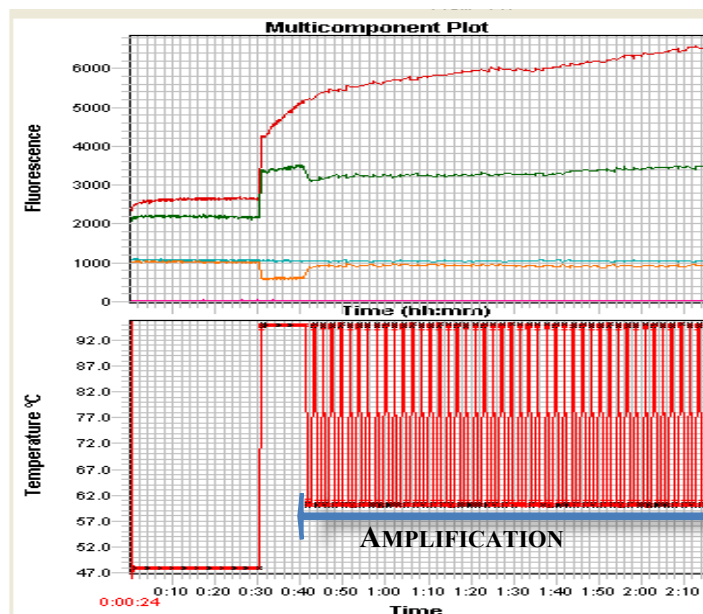


Figure 8: Multicomponent Plot du test les illustra Ready-to-Go PCR beads avec les séquences BVDV, l'EPC et l'IPC

Name	
	FAM
	VIC
	TAMRA
	ROX
	Background
	mse

Figure 9 : Légende pour les figures 1, 3 et 4

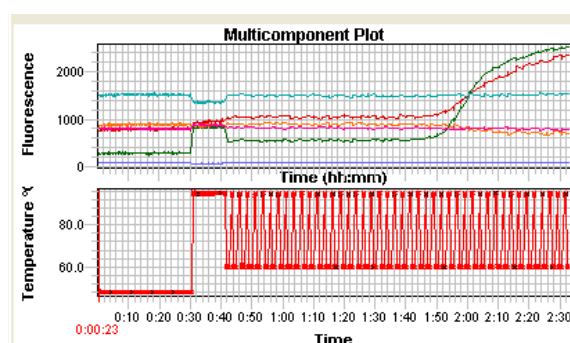


Figure 10: Multicomponent Plot obtenu pour un EPC amplifié avec le kit BVDV-Screening de LSI

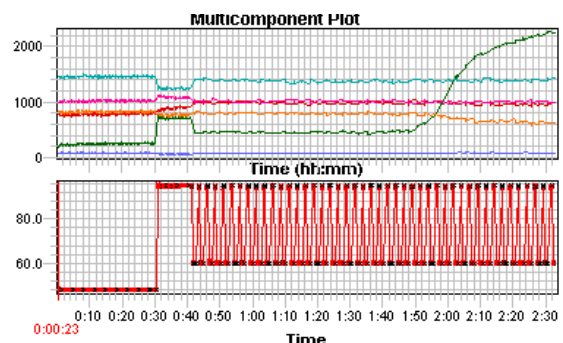


Figure 11: Multicomponent plot obtenu pour un NCS amplifié avec le kit BVDV-Screening de LSI

Discussion

Si, à la figure 8, la fluorescence du détecteur IPC (VIC) n'a pas augmenté, on voit que celle du détecteur BVDV (FAM) augmente fortement avant les premiers cycles.

La courbe d'amplification obtenue n'est pas conforme et est incompatible avec celle généralement obtenue pour un test de ce type (voir figure 10). Nous ne pouvons donc pas dire qu'une réelle amplification a eu lieu. Pour ce saut de fluorescence du détecteur FAM, nous pouvons émettre l'hypothèse qui s'agit d'une dégradation de la sonde.

Le non fonctionnement de ces billes de GE Healthcare avec les amorces, l'EPC, l'IPC et le cycle de températures utilisé chez LSI, peut être expliqué par les hypothèses suivantes:

- 1) La sonde émettant la fluorescence ne sait pas s'hybrider en raison des concentrations en sels trop faibles, notamment en $MgCl_2$. La concentration des billes de 1,5mM $MgCl_2$ par bille dans un volume final de 50 μ l (GE Healthcare, 2007) n'a pu être comparée avec celle du Master MIX qui était inconnue. Des augmentations progressives de la concentration en sels pourraient être testées afin d'observer une éventuelle amélioration.
- 2) Pour une activité optimale de la Taq Polymérase, la température d'élongation devrait être augmentée. Mais, ceci pourrait remettre en question le design des primers et de la sonde qui pourraient se détachés en raison de cette augmentation température.
- 3) Une dernière alternative serait l'utilisation d'une Taq Polymérase sous forme liquide pouvant se conserver à température ambiante (p.ex. Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen)). Ceci n'a pas pu être testé vu l'absence de Reverse Transcriptase compatible sur le marché.

Chapitre 5:

Recherche d'une méthode de détection du BVDV efficace, rapide et peu coûteuse

1. INTRODUCTION	68
2. DETECTION PAR DES METHODES IMMUNOLOGIQUES (TEST ELISA)	69
3. DETECTION PAR DES METHODES MOLECULAIRES (QPCR)	70
4. COMBINAISON DES METHODES IMMUNOLOGIQUES ET MOLECULAIRES	71
5. LA METHODE EFFICACE, RAPIDE ET PEU COUTEUSE	72

1. INTRODUCTION

L'objectif principal de ce travail était d'implémenter une méthode de détection du BVDV efficace, rapide et peu coûteuse au sein de PROINPA. Les avantages et inconvénients généraux des tests ELISA et des tests qPCR avaient déjà été abordés précédemment (Partie 1, Chapitre 3), le but de ce dernier chapitre est de les reprendre dans le cas particulier du BVDV à partir des prix réels des kits utilisés et à l'aide d'exemples fictifs.

Le tableau 1 reprend le prix des différents kits utilisés et le prix par échantillon. Ces prix sont ceux présentés en août 2010 sur le site de Progenus (en euros) et convertis en dollars lors de cette période (€ 1= 1,32\$).

Les « autres coûts » représentent la main d'œuvre, l'eau, l'électricité, le matériel, ... pour une demi-journée de travail (temps considéré pour une analyse). Ces coûts ont été calculés sur base des dépenses mensuelles de l'Unité de Biologie moléculaire et Génétique de PROINPA avec l'aide du service comptabilité de PROINPA et ont une valeur de 9,98\$/demi-journée arrondie à 10\$ afin de faciliter les calculs.

Tableau 24: Prix des kits, prix unitaires et autre coûts pour les tests ELISA et qPCR

	ELISA Anti-Anticorps	ELISA anti-antigènes	qPCR BVDV-Screening	qPCR FAST-IPI
Prix kit (en \$)	290/96 tests	395,3/ 96 tests	1646,9/96 tests	790,5/96 tests
Prix unitaire (en \$)	3,02/échantillon	4,12/échantillon	17,16/1 pool	8,23/échantillon
Prix kit d'extraction (en \$)	/	/	268,88/96 tests	/
Prix unitaire pour l'extraction (en \$)	/	/	5,38/1 pool	/
Autre coûts (en \$)	10	10	10	10

Le coût des différentes méthodes de détection sera étudié pour les 2 principaux types d'exploitations rencontrés en Bolivie, à savoir:

- Exploitation de type 1: 200 animaux (nombre de têtes généralement présentes dans les grandes exploitations de Bolivie);
- Exploitation de type 2: 20 animaux (nombre de têtes généralement présentes dans les petites exploitations traditionnelles de Bolivie).

Trois cas fictifs seront étudiés pour les 2 types d'exploitations, à savoir :

- CAS 1: Une exploitation 100% BVDV free. Le virus n'a jamais été présent;
- CAS 2: Une exploitation 50% sérologie positive, 50% sérologie négative. Le virus n'est plus présent;
- CAS 3: Une exploitation 35% sérologie positive, 15% VT, 15% IPI. Le virus est présent.

Huit types de coûts seront utilisés pour calculer le coût final des méthodes de détection dans ces deux types d'exploitation, à savoir:

- **Coût A:** Coût de la prise d'échantillon pour la totalité des animaux (même valeur que les « autres coûts » par prise de 100 échantillons (environ une demi-journée);
- **Coût B:** Coût d'une ELISA Anti-Anticorps sur 25% des animaux + 4 contrôles (2 NC et 2 PC);
- **Coût C:** Coût d'une analyse ELISA Anti-antigènes sur la totalité des animaux + 4 contrôles;
- **Coût D:** Coût d'une analyse ELISA Anti-antigènes sur 30% des animaux + 4 contrôles;
- **Coût E:** Coût d'une analyse ELISA Anti-antigènes sur 60% des animaux + 4 contrôles;
- **Coût F:** Coût d'un test *BVDV-Screening* sur 100% des animaux (en pools de 20) + 2 contrôles (NCS et EPC);
- **Coût G:** Coût d'une analyse *FAST-IPi* sur 30% des animaux + 2 contrôles (NCB et EPC) ;
- **Coût H:** Coût d'une analyse *FAST-IPi* sur 60% des animaux pour l'exploitation 1 et sur la totalité des animaux pour l'exploitation 2 + 2 contrôles.

Tableau 25: Les 8 différents coûts (en dollars) pour les deux types d'exploitation

	Exploitation 1			Exploitation 2		
	Coût total (\$)	Nombre d'animaux analysés	Coût par animaux (\$)	Coût total (\$)	Nombre d'animaux analysés	Coût par animaux (\$)
Coût A	20	200	0,10	10	20	0,50
Coût B	163,08	50	3,26	27,18	5	5,44
Coût C	840,48	200	4,20	98,88	20	4,94
Coût D	263,68	60	4,40	41,2	6	6,87
Coût E	510,88	120	4,26	65,92	12	5,49
Coût F	270,48	200	1,35	67,62	20	3,38
Coût G	510,26	60	8,50	65,84	6	10,97
Coût H	1004,06	120	8,37	181,06	20	9,05

Remarque: la réalisation des analyses ELISA anti-antigènes se faisant à partir d'échantillons de sang frais, ces analyses font systématiquement l'objet d'une nouvelle prise d'échantillon sur les animaux concernés.

2. DETECTION PAR DES METHODES IMMUNOLOGIQUES (TEST ELISA)

Si uniquement des tests ELISA sont utilisés, les 3 cas seront abordés de la manière suivante:

CAS 1: Une première analyse ELISA anti-anticorps sur 25% des animaux permettra de se rendre compte qu'aucun animal de l'échantillon du troupeau n'a une sérologie positive. Les analyses s'arrêtent là.

$$\text{Coût total} = \frac{1}{2} \text{Coût A} + \text{Coût B}$$

CAS 2: Une première analyse ELISA anti-anticorps de 25% des animaux permettra de se rendre compte que des animaux à sérologie positive sont présents dans le troupeau. Une analyse ELISA anti-antigènes devra donc être réalisée sur la totalité du troupeau afin de vérifier si le virus est toujours présent. Cette deuxième analyse mettra en évidence l'absence d'antigène dans le troupeau. Les analyses s'arrêtent là.

$$\text{Coût total} = \frac{1}{2} \text{ du Coût A} + \text{Coût B} + \text{Coût A} + \text{Coût C}$$

CAS 3: Une première analyse ELISA anti-anticorps de 25% des animaux permettra de se rendre compte que des animaux à sérologie positive sont présents dans le troupeau. Une analyse ELISA anti-antigènes devra donc être réalisée sur la totalité du troupeau afin de vérifier si le virus est toujours présent. 30% des animaux auront une antigénémie positive, ils devront être testés 3 semaines plus tard afin de détecter les 15% d'animaux IPI.

$$\text{Coût total} = \frac{1}{2} \text{ du Coût A} + \text{Coût B} + \text{Coût A} + \text{Coût C} + \text{Coût A} + \text{Coût D}$$

Le tableau 26 reprend les coûts de la détection du BVDV par des méthodes immunologiques pour les 3 cas possibles dans les deux types d'exploitation.

Tableau 26: Coûts de la détection du BVDV par tests ELISA dans les 3 cas fictifs pour les 2 types d'exploitation

	Exploitation 1 (200 animaux)		Exploitation 2 (20 animaux)	
	Coût total (\$)	Coût par animaux (\$)	Coût total (\$)	Coût par animaux (\$)
CAS 1	173,08	0,87	32,18	1,61
CAS 2	1033,56	5,17	141,06	7,05
CAS 3	1317,24	6,59	192,26	9,61

3. DETECTION PAR DES METHODES MOLECULAIRES (QPCR)

Si uniquement des tests qPCR sont utilisés les 3 cas seront abordés de la manière suivante:

CAS 1: Un *BVDV-Screening* (en pools de maximum 20 animaux) de tout le troupeau est réalisé afin de détecter la présence du virus. Aucun pool ne sera positif, les analyses s'arrêtent là.

$$\text{Coût total} = \text{Coût A} + \text{Coût F}$$

CAS 2: Un *BVDV-Screening* (en pools de maximum 20 animaux) de tout le troupeau est réalisé afin de détecter la présence du virus. Aucun pool ne sera positif, les analyses s'arrêtent là.

$$\text{Coût total} = \text{Coût A} + \text{Coût F}$$

CAS 3: Un *BVDV-Screening* (en pools de maximum 20 animaux) de tout le troupeau est réalisé afin de détecter la présence du virus. Pour l'exploitation 2, admettons que 60% des pools sont positifs en BVDV, il restera 120 échantillons à tester en *FAST-IPI*. Pour l'exploitation 1, l'unique pool sera positif, il restera 20 échantillons à tester en *FAST-IPI*.

$$\text{Coût total} = \text{Coût A} + \text{Coût F} + \text{Coût H}$$

Le tableau 27 reprend les coûts de la détection du BVDV par des méthodes moléculaires pour les 3 cas possibles dans les deux types d'exploitation.

Tableau 27: Coûts de la détection du BVDV par tests qPCR dans les 3 cas fictifs pour les 2 types d'exploitation

	Exploitation 1 (200 animaux)		Exploitation 2 (20 animaux)	
	Coût total (\$)	Coût par animaux (\$)	Coût total (\$)	Coût par animaux (\$)
CAS 1	290,48	1,45	77,62	3,88
CAS 2	290,48	1,45	77,62	3,88
CAS 3	1294,54	6,47	258,68	12,93

4. COMBINAISON DES METHODES IMMUNOLOGIQUES ET MOLECULAIRES

CAS 1: Une première analyse ELISA anti-anticorps de 25% des animaux permettra de se rendre compte qu'aucun animal de l'échantillon du troupeau n'a une sérologie positive. Les analyses s'arrêtent là.

$$\text{Coût total} = \frac{1}{2} \text{ Coût A} + \text{Coût B}$$

CAS 2: Une analyse ELISA anti-anticorps de 25% des animaux permettra de se rendre compte que certains animaux du troupeau ont une sérologie positive. Un *BVDV-Screening* (en pools de maximum 20 animaux) de tout le troupeau est réalisé afin de détecter la présence du virus. Aucun pool ne sera positif, les analyses s'arrêtent là.

$$\text{Coût total} = \frac{1}{2} \text{ Coût A} + \text{Coût B} + \text{Coût A} + \text{Coût F}$$

CAS 3: Une analyse ELISA anti-anticorps de 25% des animaux permettra de se rendre compte que certains animaux du troupeau ont une sérologie positive. Un *BVDV-Screening* (en pools de maximum 20 animaux) de tout le troupeau est réalisé afin de détecter la présence du virus. En admettant que 60% des pools (120 animaux) sont détectés positifs pour l'exploitation de type 1 et l'unique pool (20 animaux) de l'exploitation de type 2 est positif, trois schémas d'analyse possibles sont détaillés:

- a) Une analyse FAST-IPI est réalisée sur les 120 animaux des pools positifs pour l'exploitation 1 et sur les 20 animaux du pool positif de l'exploitation 2.

$$\text{Coût total} = \frac{1}{2} \text{ Coût A} + \text{Coût B} + \text{Coût A} + \text{Coût F} + \text{Coût H}$$

- b) Une analyse ELISA anti-antigènes est réalisée sur les 120 animaux des pools positifs pour l'exploitation 1 et sur les 20 animaux du pool positif de l'exploitation 2. Ensuite, les animaux du troupeau qui ont été détectés positifs en antigènes (30% du troupeau : les IPI et virémiques transitoires) sont retestés 3 semaines plus tard.

$$\text{Coût total} = \frac{1}{2} \text{ Coût A} + \text{Coût B} + \text{Coût A} + \text{Coût F} + \text{Coût A} + \text{Coût E} + \text{Coût A} + \text{Coût D}$$

- c) Une analyse ELISA anti-antigènes est réalisée sur les 120 animaux des pools positifs pour l'exploitation 1 et sur les 20 animaux du pool positif de l'exploitation 2. Ensuite, les animaux du troupeau qui ont été détectés positifs en antigènes (30% du troupeau : les IPI et virémiques transitoires) sont immédiatement retestés par analyse FAST-IPI.

$$\text{Coût total} = \frac{1}{2} \text{ Coût A} + \text{Coût B} + \text{Coût A} + \text{Coût F} + \text{Coût A} + \text{Coût E} + \text{Coût G}$$

Tableau 28: Coûts de la détection du BVDV pour les 3 cas fictifs pour les 2 types d'exploitation

	Exploitation 1 (200 animaux)		Exploitation 2 (20 animaux)	
	Coût total (\$)	Coût par animaux (\$)	Coût total (\$)	Coût par animaux (\$)
CAS 1	173,08	0,87	32,18	1,61
CAS 2	463,56	2,32	109,8	5,49
CAS 3a	1467,62	7,34	290,86	14,54
CAS 3b	1278,12	6,39	236,92	11,85
CAS 3c	1504,7	7,52	251,56	12,58

5. UNE METHODE EFFICACE, RAPIDE ET PEU COUTEUSE

Tableau 29: Récapitulatif pour les coûts des différentes méthodologies repris dans les 3 cas et les deux types d'exploitation, ainsi que la durée de l'évaluation du statut BVDV

	CAS	Exploitation 1	Exploitation 2	Temps* (jours)
		Coût par animaux (\$)	Coût par animaux (\$)	
Tests Immunologiques	CAS 1	0,87	1,61	1 ½
	CAS 2	5,17	7,05	3
	CAS 3	6,59	9,61	24 ½
Tests Moléculaires	CAS 1	1,45	3,88	1 ½
	CAS 2	1,45	3,88	1 ½
	CAS 3	6,47	12,93	2
Combinaison des deux types des tests	CAS 1	0,87	1,61	1 ½
	CAS 2	2,32	5,49	3
	CAS 3a	7,34	14,54	3 ½
	CAS 3b	6,39	11,85	26
	CAS 3c	7,52	12,58	5

*en comptant une ½ journée par analyse et 1 jour par prise d'échantillon et un intervalle de 21 jours entre deux analyses ELISA anti-antigènes.

Il paraît évident que dans le CAS 1, la réalisation d'uniquement un test ELISA anti-anticorps est beaucoup moins fastidieuse (prise d'échantillon et analyse sur uniquement 25% des animaux) et plus économique qu'un test *BVDV-Screening*, à condition de bien réaliser la prise d'échantillons dans tout le troupeau.

Dans le CAS 2, les tests moléculaires sont plus économiques mais ne disent pas qu'une infection préalable a eu lieu et que des animaux à sérologie positive sont présents dans l'exploitation. Ainsi, la combinaison des méthodes immunologiques et moléculaires de détection permet d'avoir plus d'information sur le statut BVDV de l'exploitation à un coût légèrement plus élevé et dans un délai qui reste court.

Finalement le CAS 3b, combinant les deux méthodes de détection, est le moins onéreux lorsque des animaux IPI sont présents dans l'exploitation mais c'est également la méthode de détection qui prendra le plus de temps (presque 4 semaines).

Pour une plus grande exploitation, les tests moléculaires permettront d'avoir beaucoup plus rapidement un résultat. Et si le coût est plus élevé, ce dernier peut être diminué en divisant les pools (de 20) positifs en pools de 10 à analyser par un nouveau test *BVDV-Screening* (au lieu de directement passer les échantillons des pools (de 20) positifs en test *FAST-IPI*).

Pour une plus petite exploitation, si l'obtention de l'information prendra beaucoup plus de temps (plus de 3 semaines), les tests immunologiques sont plus avantageux d'un point de vue économique que les tests moléculaires.

Nous voyons donc que les particularités du virus BVDV font qu'il n'existe pas une méthode unique efficace, rapide et économique, car chaque cas est différent. De plus, en cours d'analyse et en fonction des résultats, la méthodologie devra généralement être modifiée. Et finalement, le choix du type d'analyse utilisé sera également fonction du type d'exploitation et du statut BVDV, de l'urgence du diagnostic et de la précision voulue.

Partie 5: Conclusions et Perspectives

Cette dernière partie comprend les conclusions faites en fonction des objectifs de départ, ainsi que les améliorations et perspectives à apporter.

Conclusions et Perspectives

Ce travail avait pour objectif d'implémenter une méthode de détection du BVDV au sein de la fondation PROINPA en Bolivie. Afin d'atteindre cet objectif nous voulions savoir si du BVDV était bien présent dans les régions visées, s'il était possible d'implémenter les méthodes de détection du BVDV utilisées en Belgique et quels points étaient à améliorer au niveau de ces méthodes de détection.

Dans un premier temps, afin de savoir si du BVDV était présent dans les troupeaux bovins de la région de Cochabamba et dans les troupeaux de lamas de la région de La Paz, une analyse immunologique ELISA bloquant les anticorps fut réalisée. La présence d'anticorps, tant au niveau des troupeaux de bovins qu'au niveau des troupeaux de lamas, confirma que le BVDV est ou a été présent dans ces deux types de troupeaux et donc dans ces deux régions.

Deuxièmement, les méthodes immunologiques et moléculaires utilisées en Belgique ou ailleurs pour la détection du BVDV ont été testées au sein de PROINPA, à savoir: un test ELISA «LSIVET BVD/BD p80 BLOCKING ONE STEP», un test ELISA «LSIVET BVD/BD ANTIGEN CAPTURE-SKIN L.O.», un test qPCR *BVDV-Screening* et un test qPCR *FAST-IPI*.

Le matériel et l'infrastructure étaient disponibles tant pour les analyses immunologiques (incubateur, lecteur ELISA,...) que moléculaires (centrifugeuses, congélateur, thermocycleur avec un ordinateur pour la programmation,...). La main d'œuvre était également qualifiée pour mettre au point ces deux types d'analyses.

Le problème principal résidait au niveau de la logistique pour les tests qPCR. En effet, les kits utilisés (kits qPCR *BVDV-Screening* et qPCR *FAST-IPI*) devaient se conserver à -20°C tout en étant importés depuis la Belgique jusqu'en Bolivie. Le trajet Belgique-Bolivie ayant duré 10 jours dû à des problèmes douaniers routiniers, le kit a subi trop des cycles de congélation et décongélation conduisant à sa dégradation. Cette hypothèse de dégradation et d'inefficacité a été émise suite aux différentes analyses moléculaires échouées, au fonctionnement occasionnel du kit et après concertation avec le fabricant (LSI, France).

Un autre bémol au niveau de la logistique et au sein des laboratoires était le manque de locaux, qui aurait peut-être permis d'éviter des problèmes de contamination. Depuis peu, un nouveau bâtiment spécialement conçu pour le diagnostic animal est en construction au sein de PROINPA. Ainsi, l'extraction, le dépôt des MIX, le dépôt des échantillons et l'amplification pourront se faire dans des pièces différentes.

Les statuts BVDV des deux exploitations de bovins ont pu être déterminés et dans les deux cas du BVDV avait déjà été présent (présence d'animaux à sérologie positive) mais ne l'était plus lors des analyses (absence d'animaux IPI ou en virémie transitoire).

Les tests sur les lamas n'ont pas permis d'évaluer le statut BVDV exact des deux élevages se trouvant à La Paz (à presque 1000 km de Cochabamba). Le but principal des tests sur cette espèce était de voir si les méthodes de détection immunologique et moléculaire du BVDV chez les bovins fonctionnaient également pour les lamas. Le test ELISA anti-anticorps ayant donné des

résultats positifs et négatifs nous pouvons dire que ce kit « LSIVET BVD/BD p80 BLOCKING ONE STEP » détecte les anticorps anti-BVDV produits par les lamas. L'ELISA détectant les antigènes n'ayant donné que des résultats négatifs, nous ne pouvons pas avec certitude dire que le kit « LSIVET BVD/BD ANTIGEN CAPTURE-SKIN L.O. » détecte les antigènes du BVDV chez les lamas. Les tests qPCR *FAST-IPI* réalisés en Belgique avec un kit fonctionnel, n'ont pas détecté de BVDV chez les 3 lamas testés mais l'IPC est sorti positif ce qui prouve que l'extraction d'ARN à partir du plasma de lamas est possible avec le kit « Quiagen RNeasy Mini Kit ».

La réalisation de tests sur des lamas présentant des symptômes de la BVD ou inoculés avec le virus, permettrait de vérifier le bon fonctionnement du test ELISA anti-antigènes et des deux tests qPCR sur cette espèce. Même si d'un point de vue théorique (même structure d'antigène et même souche de virus que les bovins), ces tests devraient fonctionner sans aucun problème pour les lamas.

Finalement, vu la particularité du virus BVDV à se transmettre de manière horizontale et verticale, en fonction du statut BVDV de l'exploitation, en fonction de l'urgence du diagnostic, en fonction du type d'exploitation, ... la méthodologie de détection varie et est adaptée selon les résultats obtenus en cours d'évaluation du statut BVDV. Il n'existe donc pas une méthode unique efficace, rapide et peu coûteuse de détection du BVDV au sein d'un troupeau ou d'une exploitation.

En troisième et dernier lieu, il était question d'améliorer et/ou d'adapter les méthodes de détection implémentées en fonction des problèmes rencontrés.

L'implémentation de la méthode de détection moléculaire ayant rencontré des problèmes dus aux conditions de conservation des kits qPCR *BVDV-Screening* et qPCR *FAST-IPI* de LSI, l'élaboration d'un kit avec des conditions de conservation moins strictes a été tentée.

Dans ce cadre, la lyophilisation des constituants du kit *BVDV-Screening* a d'abord été privilégiée et a fonctionné pour les séquences BVDV (sondes et amorces) et les contrôles positifs internes et externes (IPC et EPC). Par contre, les deux composants contenant des enzymes (le Master MIX et l'enzyme RT) n'ont pas pu être lyophilisés en raison de la présence de glycérol. Une méthode alternative était l'utilisation et la combinaison des « Illustra Ready-to-Go RT-PCR beads », comprenant les constituants du Master MIX et de l'enzyme RT, avec les séquences BVDV et le cycle de température du kit *BVDV-Screening* de LSI, mais ceci n'a pas fonctionné.

Des analyses ultérieures sur les températures d'activité optimale de la Taq et de la RT, sur la concentration en MgCl₂ et autres sels dans les billes, avec différents cycles de températures, sur le design des primers, ... sont des perspectives qui permettraient d'obtenir plus d'informations pour éventuellement faire fonctionner ces billes avec nos séquences BVDV lyophilisées.

En conclusion: Le BVDV est un virus complexe et particulier dont la détection ne peut se faire à partir d'une méthodologie unique. De plus, le développement des différents tests en Bolivie est entravé par le problème d'envoi des kits qui ont des conditions de conservation strictes. Et si la formulation d'un kit de détection moléculaire du BVDV se conservant à température ambiante est certainement possible, elle n'en est pas pour autant moins fastidieuse.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahlquist, P., Noueir, A., Lee, W., Kushner, D., & Dye, B. (2003). Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *J. Virol.* , 77 (15), pp. 8181-8186.
- Al-Soud, W., Jönsson, L., & Rådström, P. (2000). Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* , 38, pp. 345-350.
- Backer, J. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* , 11, pp. 425-445.
- Beaudeau, F., Belloc, C., Seegers, H., Assie, S., Sellal, E., & Joly, A. (2001). Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Vet. Microbiol.* , 80, pp. 329-337.
- Belknap, E., Collins, J., Larse, R., & Conrad, K. (2000). Bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J. Vet. Diagn. Invest.* , 12, pp. 568-570.
- Bitsch, V., & Rønsholt, L. (1995). Control of bovine viral diarrhoea virus infection without application of vaccines. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* , 11, pp. 627-640.
- Bolin, S., & Ridpath, J. (1998). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.* , 10, pp. 135-139.
- Bolin, S., Ridpath, J., Black, J., Macy, M., & Roblin, R. (1994). Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods* , 48, pp. 211-221.
- Boyle, D., Rosengren, S., Bugbee, W., Kavanaugh, A., & Firestein, G. (2003). Quantitative Biomarker Analysis of Synovial Gene Expression: Results. *Arthritis Res. Ther.* , 5 (6), pp. 352-360.
- Brownlie, J., Clarke, M., & Howard, C. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* , 114 (22), pp. 535-536.
- Brownlie, J., Clarke, M., Howard, C., & Pocock, D. (1987). Pathogenesis and epidemiology of Bovine viral diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vet.* , 18, pp. 157-166.
- Bustin, S. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* , pp. 169-193.
- Carman, S. (2005, juillet 4). *Recommandations for testing for Bovine Viral Diarrhoea Virus in Alpacas et Llamas*. Consulté en août 2009 sur Northwest Alpacas: www.alpacas.com
- Celedon, M. (1997). Prevalencia de anticuerpos seroneutralizantes para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne de la región Metropolitana de Chile. *Av.Cs.Vet.* , 12, pp. 98-100.
- CIA. (2009). *World Factbook: South America: Bolivia*. Consulté en mars 2010 sur Central Intelligence Agency: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/bl.html>
- Collet, M., Anderson, D., & Retzel, E. (1988). Comparisons of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhoea Virus with Members of the Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* , 69, pp. 2637-2643.
- Conzelmann, K.-K. (1998). Non segmented Negative-Strand RNA Viruses : Genetics and Manipulation of Viral Genomes. *Annu. Rev. Genet.* , 32, pp. 123-162.

Dairy producers. (2009). *Bovine Viral Diarrhea Virus*. Consulté en août 2009 sur Producer Wisdairy: <http://producer.wisdairy.com/dairyresources>

Dubovi, E. (1992). Genetic diversity and BVDV. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* , 15 (3), pp. 155-162.

Duffell, S., & Harkness, J. (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* , 117 (10), pp. 240-245.

Dufour, B., Repiquet, D., & Touratier, A. (1999). Economic studies in animal health decision-making: the cost-benefit ratio of eradicating bovine virus diarrhoea in France. *Revue Scientifique et Technologique (OIE)* , 18 (2), p. 520.

Entrican, G., Dand, A., & Nettleton, P. (1995). A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* , 43, pp. 65-74.

FAO. (2005, mars). *Bolivia: Livestock sector brief*. Consulté en mai 2010 sur FAO: Bolivia country profile: http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/publications/sector_briefs/lbs_BOL.pdf

Felmer, A. (2009). Prevalencia y distribución espacial de brucelosis, leucosis bovina, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX Región, Chile. *Arch Med Vet* , 41, pp. 17-26.

Fourichon, C. (2004). Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with BVDV. *2nd European Symposium on BVDV Control*. Porto: INRA.

Fowler, M. (1998). Infectious diseases in medicine and surgery of South American camelids. In M. Fowler, *Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco*, (2 ed., pp. 148-194). Iowa State University Press, Ames, IA.

Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). *Real-time PCR*. Consulté en mai 2010 sur Current Protocols Essential Laboratory Techniques: <http://www.currentprotocols.com>

Fulton, R., & Ridpath, J. (2009). Knowledge gaps impacting the development of BVDV control programs in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* , 235 (10), pp. 1171-1179.

Gardiner, A., & Barlow, R. (1971). Experiments in Border Disease. *J. Comp. Pathol.* , 82, pp. 19-35.

GE Healthcare. (2007). *Illustra Ready-to-Go RT-PCR Beads: Product Booklet*. Consulté en août 2010 sur GE Healthcare: www.gehealthcare.com

Gillespie, J., Coggins, L., Thompson, J., & Baker, J. (1961). Comparaison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. *Cornell Vet* , 51, pp. 155-159.

Gogorza, L., Morán, P., Larghi, J., Seguí, R., Lissarrague, C., Saracco, M., et al. (2005). Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in seropositive cattle. *Prev. Vet. Med.* , 72 (1-2), pp. 49-54.

Goyal, S., & Ridpath, J. (2005). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control* (1 ed.). Iowa State University Press: Wiley-Blackwell.

Guarino, H., Núñez, A., Repiso, M., Gil, A., & Dargatz, D. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev. Vet. Med.* , 85, pp. 34-40.

Gunn, G., Stott, A., & Humphry, R. (2004). Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. *Vet. J.* , 167, pp. 143-149.

Gunn, J. (2005). *Financial-economic considerations of decision making on control and prevention of BVD in the EU*. Consulté en août 2009 sur BVD-control: <http://bvdv-control.org>

Higuchi, R. (1989). *PCR technology: principles and applications for DNA amplification* (1 ed.). New York: Stockton Press.

Hilbe, M., Stalder, H., Peterhans, E., Haessig, M., Nussbaumer, M., Egli, C., et al. (2007). Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* , 19, pp. 28-34.

Hofmann, M., & Frölich, K. (1995). Isolation of Bovine Viral Diarrhoea Virus-like Pestiviruses from Roe Deer (*Capreolus capreolus*). *J. Wildl. Dis.* , 31 (2), pp. 243-246.

Houe, H. (2003). Economic Impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* , 31 (2), pp. 137-143.

Houe, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Microbiol.* , 64 (2-3), pp. 89-107.

Houe, H., Lindeberg, A., & Moennig, V. (2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* , 18, pp. 427-436.

Howard, C., Brownlie, J., & Clarke, M. (1987). Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.* , 13, pp. 361-369.

Huck, R. (1973). Transmission of border disease. *Vet. Rec.* , 92, p. 151.

IFAD. (2001). *Bolivia: Camelid Producers Development Project in the Andean High Plateau*. Consulté en mai 2010 sur IFAD: International Fund for Agricultural Development: http://www.ifad.org/lrkm/region/pl/bo_354.htm

Juliá, S., Craig, M., Jiménez, L., Pinto, G., & Weber, E. (2009). First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Prev. Vet. Med.* , 90, pp. 274-277.

Kampa, J., Ståhl, K., Moreno-López, J., Chanlun, A., Aiumlamai, S., & Alenius, S. (2004). BVDV and BHV-1 Infections in dairy herds in Northern and Northeastern Thailand. *Acta Vet. Scand.* , 45 (4), pp. 182-192.

Kindt, T., Goldsby, R., & Osborne, B. (2006). *Immunology* (6 ed.). New York: Kuby.

Laboratoire Service Internationale. (2009). *BVD/MD- Maladie des Muqueuses*. Consulté en août 2009 sur LSIVET: <http://www.lsivet.com>

Laureyns, J., Ribbens, S., & De Krui, A. (2009). Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. *Vet. J.*

Letellier, C., De Meulemeester, L., Lomba, M., Mijten, E., & Kerkhofs, P. (2005). Detection of BVDV persistently infected animals in Belgium: Evaluation of the strategy implemented. *Prev. Vet. Med.* , 72, pp. 121-125.

Lindberg, A. (2002). Epidemiology and Eradication of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infections: Studies on transmission and prenatal diagnosis of persistent infection. *Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala* .

- Lonely Planet. (2007). *Bolivia: Guide de Voyage* (3ème ed.). Lonely Planet.
- Marzocca, M., Seki, C., Giambiagi, S., Robiolo, B., Schauer, R., Dus Santos, M., et al. (2007). Truncated E2 of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Drosophila melanogaster* cells: A candidate antigen for a BVDV ELISA. *J. Virol. Methods*, *144*, pp. 49-56.
- McClurkin, A., Littledike, E., Cutlip, R., Frank, G., Coria, M., & Bolin, S. (1984). Production of Cattle Immunotolerant to Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Can J Comp Med*, *48*, pp. 156-161.
- McGowan, M., Kirkland, P., Rodwell, B., Kerr, D., & Carroll, C. (1993). A field investigation of the effects of bovine viral diarrhoea virus infection around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. *Theriogenology*, *39* (2), pp. 443-449.
- Morata, P., Queipo-Ortuño, M., & de Dios Colmenero, J. (1998). Strategy for Optimizing DNA Amplification in a Peripheral Blood PCR Assay Used for Diagnosis of Human Brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, *36* (9), pp. 2443-2446.
- Nettleton, P., Herring, J., & Corrigan, W. (1980). Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a Scottish red deer. *Vet. Rec.*, *107*, pp. 425-426.
- Niskanen, R. (1993). Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.*, *133* (14), pp. 341-344.
- Odeon, A., Leunda, M., Faverin, C., Boynak, N., Vena, M., & Zabal, O. (2009). In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions. *Rev. Argent. Microbiol.*, *41*, pp. 79-85.
- OIE. (2008). Chapitre 2.4.8- Diarrhée virale bovine. In OIE, *Manuel terrestre de l'OIE* (pp. 761-776).
- Olafson, P., McCallum, A., & Fox, F. (1946). An apparently new transmissible diseases of cattle. *Cornell Vet*, *36*, pp. 205-213.
- Oostra, M., & Malaver, L. (2003). *Bolivia: mensen, politiek, economie, cultuur, milieu*. Den Haag: Koninkelijk Instituut van de Tropen.
- Paton, D., Simpson, V., & Done, S. (1992). Infections of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Vet. Rec.*, *131*, pp. 185-188.
- Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotech.*, *2* (2), pp. 2-11.
- Rådström, P., & Al-Soud, W. (2001). Purification and characterization of PCR- inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.*, *39*, pp. 485-493.
- Ramsey, F., & Chivers, W. (1953). Mucosal disease of cattle. *North Am Vet*, *34*, pp. 629-633.
- Renshaw, R., Ray, R., & Dubovi, E. (2000). Comparison of Virus Isolation and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Bulk Milk Tank Samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, *12*, pp. 184-186.
- Ridpath, J. (2010). Bvdv: Detection, Risk Management and Control. *Countermeasures to Control and Support Eradication of Bovine Viral Diarrhoea Virus (Bvdv)* (pp. 151-158). Texas: Proceedings of Texas Veterinary Medical Association.
- Ridpath, J., & Bolin, S. R. (1998). Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol. Cell. Probes*, *12*, pp. 101-106.

- Routard. (2009). *Pérou, Bolivie: le guide du routard* (1 ed.). Rotolito (Italie): Hachette.
- Rufenacht, J., Schaller, P., Strasser, M., Peterhans, E., & Audigé, L. (2000). Prevalence of cattle infected with bovine viral diarrhoea virus in Switzerland. *Vet. Rec.* , 147 (15), pp. 413-417.
- Saliki, J., Huchzermeier, R., & Dubovi, E. (2006). Evaluation of a New Sandwich ELISA Kit That Uses Serum for Detection of Cattle Persistently Infected with BVD Virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* , 916, pp. 358-363.
- Sandvik, T. (2005). Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev. Vet. Med.* , 72, pp. 3-16.
- Sellal, E. (11 Juin 2003). *Test PCR BVD Spécificités et perspectives de l'outil pour les GDS*. Laval: GDS Grand Ouest .
- SENASAG. (2010). *Inicio*. Consulté en mai 2010 sur SENASAG BOLIVIA: www.senasag.gov.bo
- Sopocachi. (2006, aout 14). *INLASA cumple 98 años de infatigable labor al servicio de la salud*. Consulté en mai 2010 sur Organizarion Panamericana de la Salud- Bolivia: <http://www.ops.org.bo>
- Stewart, W., Carbrey, E., Jenney, E., Brown, C., & Kresse, J. (1971). Bovine viral diarrhoea infection in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* , 159, pp. 1556-1563.
- Terpstra, C., & Wensvoort, G. (1988). Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.* , 45, pp. 137-142.
- Thiry, E. (2007). *Virologie clinique des ruminants* (2 ed.). Paris: Editions du Point Vétérinaires.
- Tibary, A., & Anouassi, A. (1997). Reproductive management of camelidae. In A. Tibary, & A. Anouassi, *Theriogenology in Camelidae. Anatomy, Physiology, Pathology and Artificial Breeding*. (pp. 459-479). Rabat, Maroc: Actes Edition.
- Trilling, A. (2009). *Development of technologies to organize antibodies on surfaces* . Consulté en juillet 2010 sur Wageningen University: <http://www.orc.wur.nl>
- Tse, C., & Capeau, J. (2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* , 61 (3), pp. 279-293.
- Valle, P., Skjerve, E., Martin, S., Larssen, R., Østerås, O., & Nyberg, O. (2000, August 6-11). A cost benefit evaluation of the Norwegian bovine virus diarrhoea control and eradication program. *Proceedings of the 9th Symposium of the International Society of Veterinary Epidemiology and economics (ISVEE)* , 1189-1191. Breckenridge, Colorado, USA.
- Vera, R. (2006, mai). *Bolivia: country pasture/forage resource profiles*. Consulté en mai 2010 sur FAO: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Bolivia/Bolivia.htm>
- WAHID Interface. (2008-2009). *Diarrhée virale bovine: Cartes de Distribution des maladies*. Consulté en mai 2010 sur OIE: <http://www.oie.int/wahis/>
- WAHID Interface. (2009). *Situation Sanitaire Bolivie en 2009*. Consulté en mai 2010 sur OIE: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=country_status&year=2009
- Ward, G. (1971). Experimental infection of pregnant sheep with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Cornell Vet* , 61, pp. 179-191.

Wentz, P., Belknap, E., Kenneth, V., Collins, J., & Pugh, D. (2003). Evaluation of Bovine viral diarrhoea virus in New World Camelids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* , 223 (2), pp. 223-228.

Winslow, F. (2009). *Just what is the impact of BVDV on the cattle industry?* Consulté en août 2009 sur IDEXX- Livestock/poultry testing: <http://www.idexx.com/production/livestockpoultrynews>

2. SOURCES ELECTRONIQUES NON COMPLETES

¹ Bolivie : República de Bolivia (déc 2009), <http://www.tlfg.ulaval.ca>, consulté en mars 2010, voir Partie 1, Chapitre 1, page 2 ;

² Informations sur le BVDV : *History of BVDV*, <http://www.bvd-info.ch/agriculteurs> , consulté en aout 2009, voir Partie 1, Chapitre 2, page 9 ;

³ Basé sur l'image concernant la multiplication du virus de l'hépatite E retrouvée sur <http://www.cnr.vha-vhe.aphp.fr> (2009), consulté en aout 2009, voir Partie 1, Chapitre 2, verso page 10 ;

⁴ Informations sur le BVDV : *Infections intra-utérines*, <http://www.bvd-info.ch/agriculteurs> , consulté en aout 2009, voir Partie 1, Chapitre 2, verso page 11 ;

⁵ EXPRESS : *BVD & IP : Economic of BVDV virus*, <http://expressverified.ca>, consulté en aout 2009, voir Partie 1, Chapitre 2, page 15 ;

⁶ Beefmagazine : *Persistently infected calves cost* (2007), <http://beefmagazine.com/health/BVD>, consulté en aout 2009, voir Partie 1, Chapitre 2, page 15 ;

⁷ GDS Rhone-Alpes : *Les analyses BVD* (17/8/2006) <http://www.gds38.asso.fr>, consulté en aout 2009, voir Partie 1, Chapitre 3, page 18 ;

^{8,11,13} La réaction de Polymérisation en chaîne (PCR) : Principe et applications, Nimes : Ecole de l'ADN, <http://www.ecole-adn.fr>, consulté en août 2009, voir Partie 1, Chapitre 3, page 19, 20, 24 ;

⁹ Principles of the PCR (1999), <http://users.ugent.be/~avierst/principles/pcr.html>, consulté en août 2009, voir Partie 1, Chapitre 3, page 19 ;

^{10,14,15} TaqMan® PCR Reagent Kit with controls, with AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Protocol, Applied Biosystems, USA 11/2007, voir Partie 1, Chapitre 3, page 21, 24, 25 ;

¹² The International Equipment Facility : Real Time PCR <http://www.departments.agri.huji.ac>, consulté en mai 2010, voir Partie 1, Chapitre 3, page 24;

^{16,17} LDA²² : *Présentation de la technique PCR : avantages et limites* (30/12/2004), <http://www.lad22.com>, consulté en août 2009, voir Partie 1, Chapitre 3, page 26 ;

¹⁸ Stop BVD : BVDV control and prévention, www.stopbvd.com, consulté en aout 2009, voir Partie 1, Chapitre 4, page 32