



Implémentation d'une méthode de détection du virus de la diarrhée virale bovine au sein de la fondation de promotion des productions andines PROINPA

Marjolaine Martin

Introduction

Cadre du travail:

La Bolivie
(PROINPA)



- Nouveau statut BVDV depuis 2009 (OIE,2009)
- Problème au niveau de l'efficacité des structures sanitaires
- Les camélidés andins: réservoir potentiel à BVDV
- Volonté de la Bolivie de développer les élevages de lamas pour la production de viande diététique

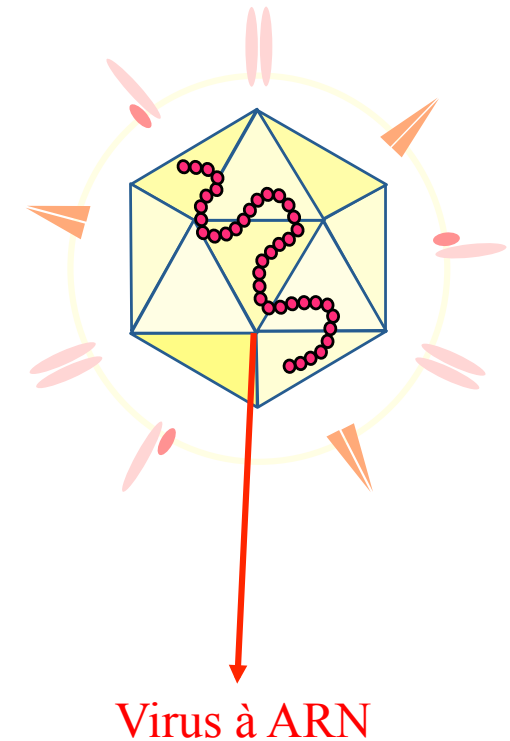
Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV)

Génotype : Type I (a et b) et type II

Biotype : NCP et CP

1/ Protéines structurales → Variabilité importante

2/ Protéines non structurales → Variabilité limitée



La pathologie

Transmission horizontale

- Via les sécrétions nasales et orales, fèces et urine, matériel contaminé,...
- Incubation 5 à 7 jours
- Risque d'hémorragies (type II)
- Immunité acquise en +/- 3 semaines



La pathologie

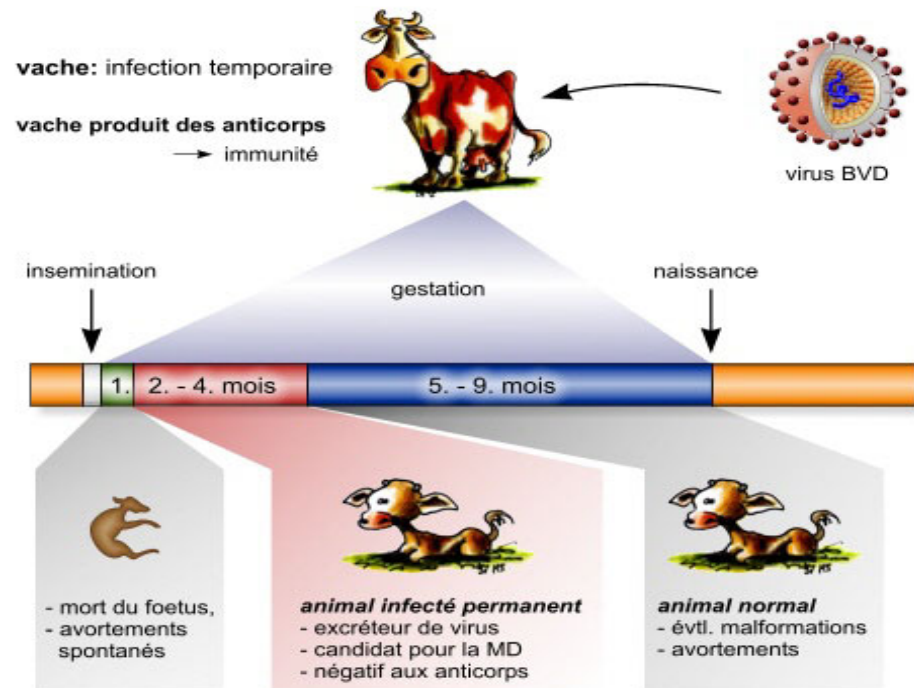
Transmission horizontale

- Via les sécrétions nasales et orales, fèces et urine, matériel contaminé,...
- Incubation 5 à 7 jours
- Risque d'hémorragies (type II)
- Immunité acquise en +/- 3 semaines

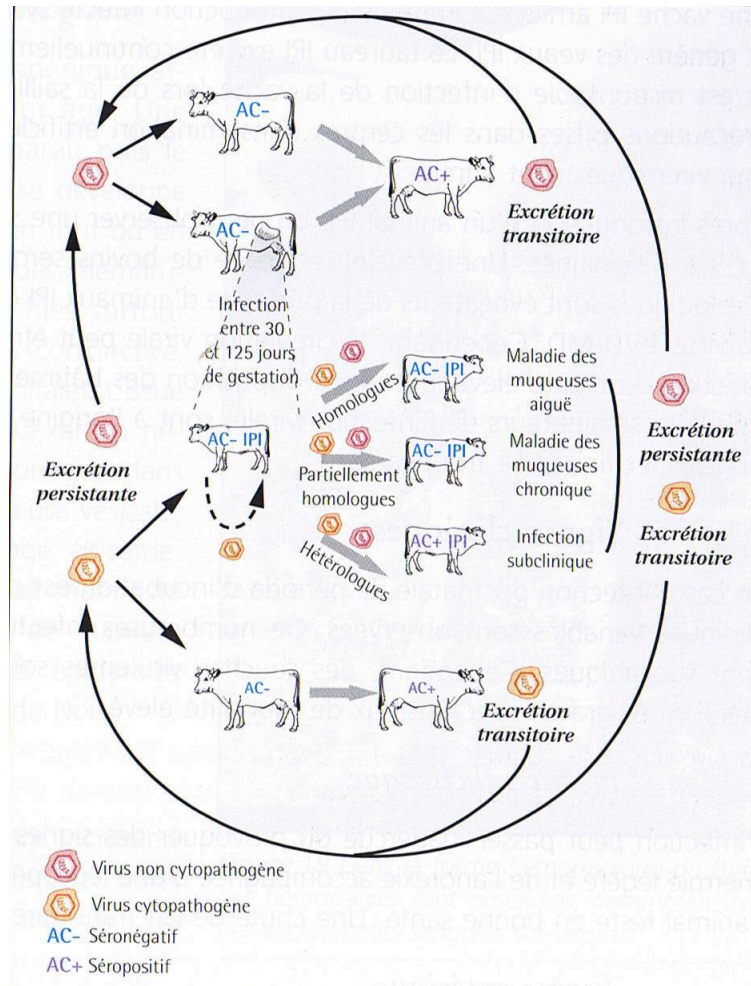


Transmission verticale

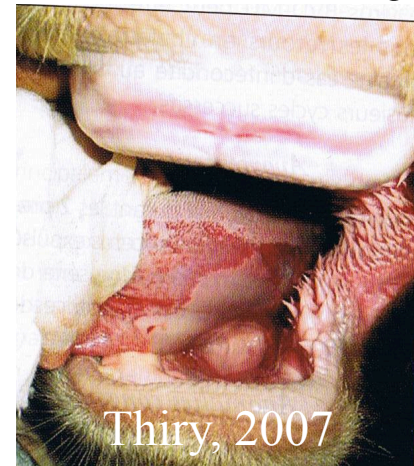
- Via la mère (et le placenta)
- Formation d'animaux IPI :
 - ✓ Symptômes inapparents
 - ✓ Porteurs du virus
 - ✓ Donnent des animaux IPI



La maladie des muqueuses (MD)



- Animaux IPI
- Souche CP
- Souches NCP et CP doivent être proches génétiquement
- Mort dans les 7 jours



La détection du BVDV

- L'isolation virale
- L'ELISA
- La PCR en temps réel

L'isolation virale

Principe :

Mise en culture monocouche de cellules de bovins, si le virus est présent un effet cytopathogène est engendré.

+ : Réalisable à partir de toutes sortes de matrices

- : Mise en œuvre fastidieuse, risque de contamination et pour les manipulateurs

La méthode ELISA

Détection des ANTICORPS

= Détecter les anticorps produit
(par l'animal infecté) contre
le BVDV.

+ : Détecte une infection dans
le passé, et une éventuelle
vaccination

- : Détection indirecte du virus

La méthode ELISA

Détection des ANTICORPS

= Détecter les anticorps produit
(par l'animal infecté) contre
le BVDV.

+ : Détecte une infection dans
le passé, et une éventuelle
vaccination

- : Détection indirecte du virus

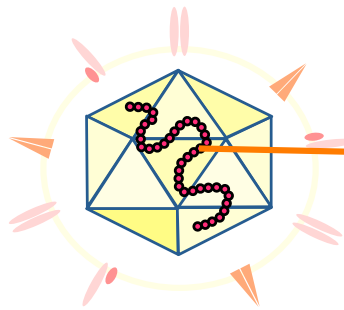
Détection des ANTIGENES

= Détecter les antigènes du
virus BVDV.

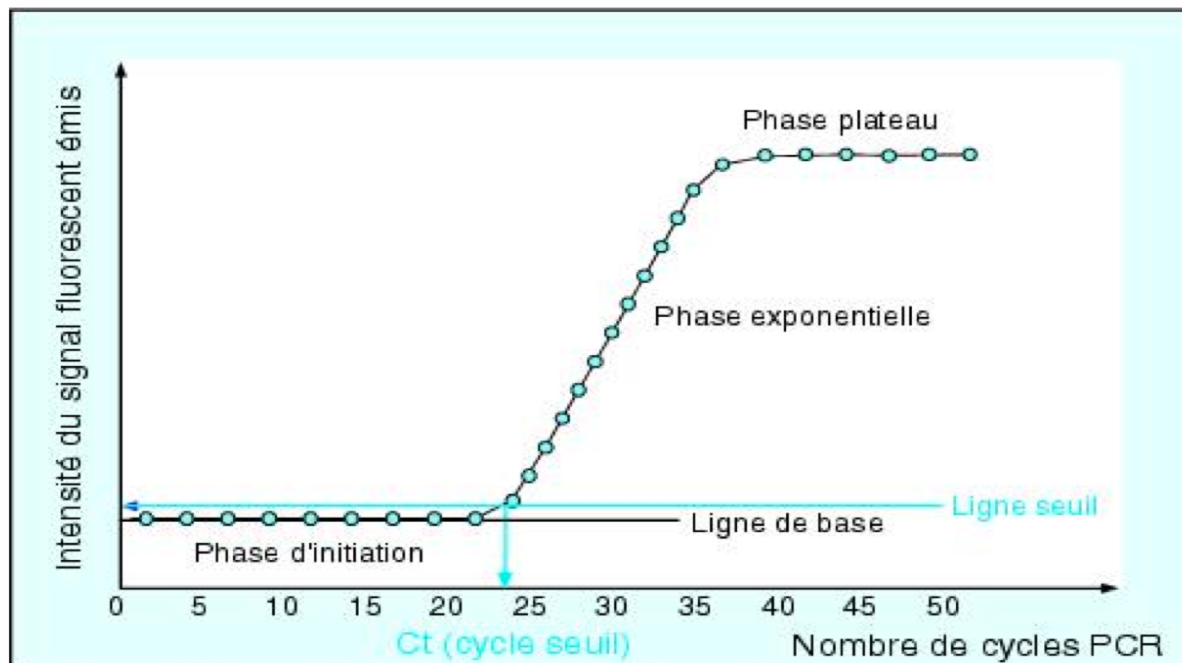
+ : Détecte la présence du virus
→ détection directe du virus

- : Ne permet pas une
différenciation immédiate
entre les IPI et les VT

La PCR en temps réel



Virus à ARN



⇒ PCR classique

⇒ qPCR

	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

Contrôle du BVDV

Eradication

- Des animaux IPI
- Complexe
- Efficace
- Evolution vers un statut *BVDV-free*
- Coût élevé
- Réalisé au sein d'une région ou d'une nation
- Pas encore en Belgique
- Pas encore en Bolivie

Vaccination

- De tout le troupeau
- Simple
- Répétitions tous les 2 ans
- Evolution vers un statut à sérologie positive
- Coût élevé
- Réalisé au sein d'une exploitation
- Pratique en Belgique
- Très peu pratiqué en Bolivie

Objectifs

- 1/ La présence du BVDV dans la région de CCBB et de La Paz est-elle d'actualité?
- 2/ Est-il possible d'implémenter les méthodes de détection du BVDV utilisées en Belgique, en Bolivie ?
- 3/ Quels points doivent être améliorés ou solutionnés pour l'implémentation de ces méthodes de détection ?

Matériel et Méthodes

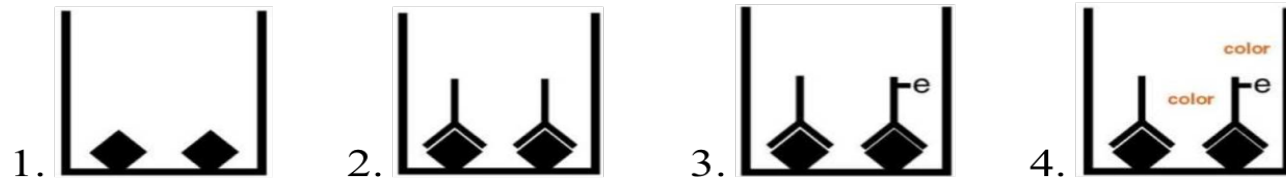
- Les troupeaux et la région:
 - CCBB: Granja Pairumani (grande ferme)
Granja Don Gabriel (petite ferme)
 - La Paz: deux élevages d'une trentaine de lamas
- La prise d'échantillons



- Préparation des échantillons
 - Tube 1: plasma extrait conservé à -20°C
 - Tube 2: sang + EDTA conservé à 4°C

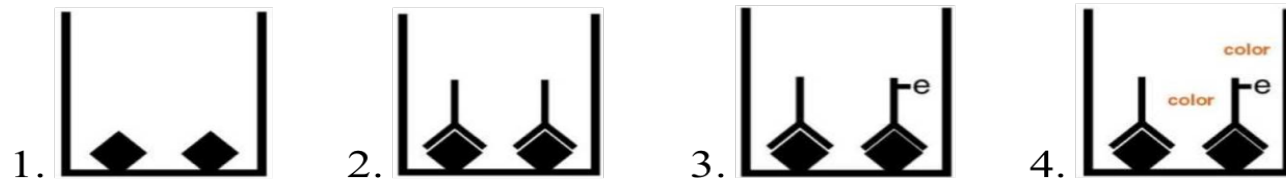
Les tests ELISA

- Détection des Ac avec le kit « LSIVET BVD/BD p80 BLOCKING ONE STEP » → Plasma ou sérum

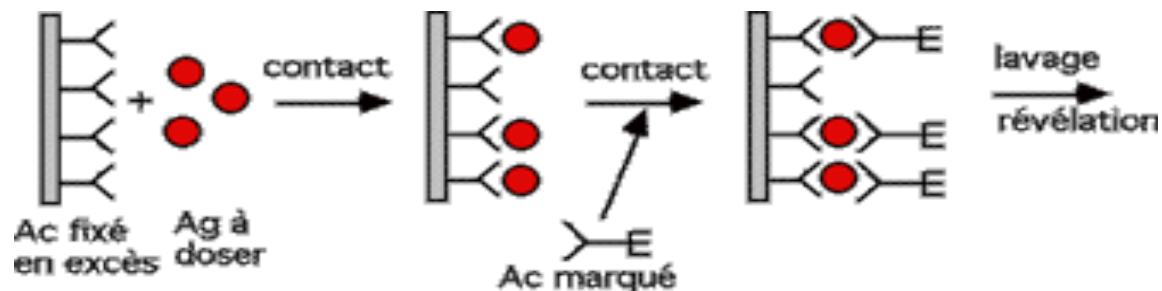


Les tests ELISA

- Détection des Ac avec le kit « LSIVET BVD/BD p80 BLOCKING ONE STEP » → Plasma ou sérum



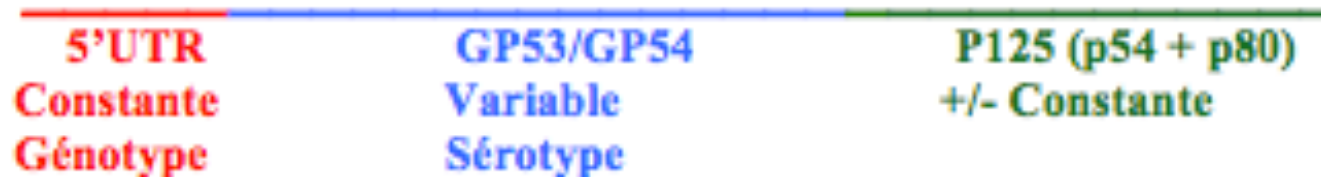
- Détection des Ag avec le kit « LSIVET BVD/BD ANTIGEN CAPTURE-SKIN L.O. » → Sang frais



- 2 contrôles négatifs et 2 contrôles positifs fournis avec le kit

Les tests de PCR en temps réel

Amplification de la région 5' UTR du génome viral



Le BVDV-Screening :

- Extraction préalable avec le kit « Quiagen RNeasy Mini-kit »
- Détection en pool des IPI, en individuel des VT

Le BVDV- Fast IPI :

- Détection individuelle
- Uniquement IPI (ou en début de VT)

Les Résultats sont interprétés en fonction des Ct obtenus

$Ct > 45 = \text{Négatif}$

$Ct < 45 = \text{Positif}$

	Composé	Contrôle	Ct attendu
NC	Eau + MIX	De l'absence de contamination au niveau du MIX	BVDV: $Ct > 45$ IPC: $Ct > 45$
NCS	Eau ayant subit l'extraction + MIX	De l'absence de contamination lors de l'extraction	BVDV: $Ct > 45$ IPC: $Ct < 45$
EPC	Échantillon positif extrait + MIX	De la bonne amplification et détection des échantillons positifs	BVDV: $Ct < 45$ IPC: $Ct < 45$
IPC	Introduit dans les contrôles et les échantillons lors de l'extraction	D'une extraction réussie et de l'absence d'inhibiteurs de PCR	l'absence

Résultats et Discussions

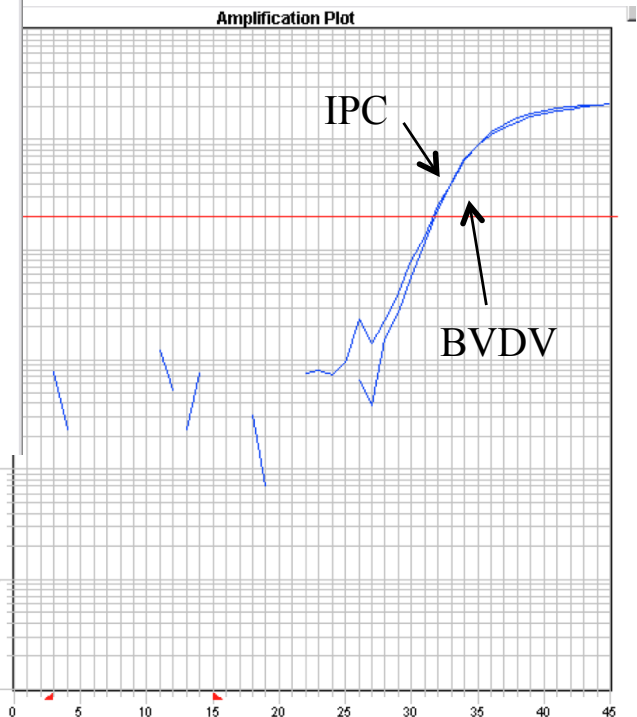
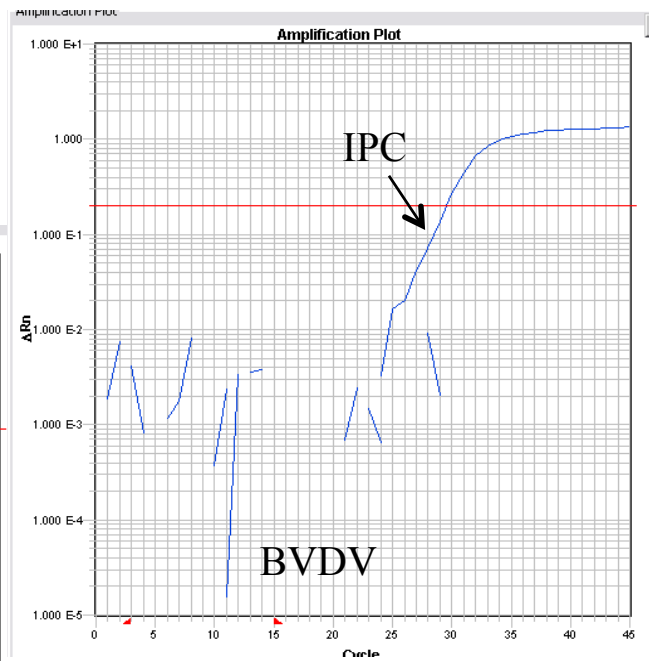
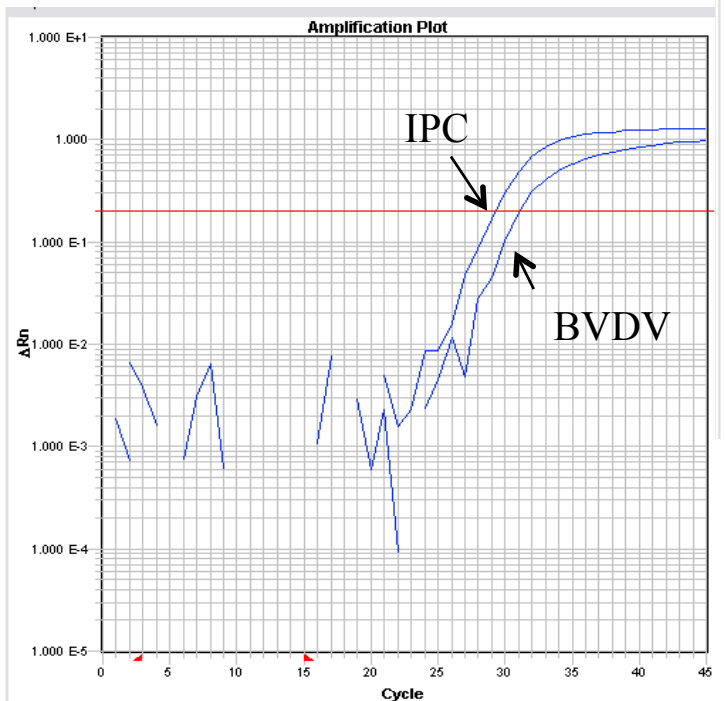
1/ Contrôles préalable des kits de détection moléculaire du

BVDV

BVDV-Screening

Fast IPI

Négatif



← Positifs →

2/ Analyse ELISA anti-anticorps sur 25% des animaux des exploitation de bovins

Granja Pairumani:

Présence principalement d'animaux à sérologie positive (46/50)
dont 100% (3/3) des veaux de < 12 mois négatifs en anticorps

H: Le virus a probablement circulé il y a plus d'un an mais n'est probablement plus présent

2/ Analyse ELISA anti-anticorps sur 25% des animaux des exploitation de bovins

Granja Pairumani:

Présence principalement d'animaux à sérologie positive (46/50)
dont 100% (3/3) des veaux de < 12 mois négatifs en anticorps

H: Le virus a probablement circulé il y a plus d'un an mais n'est probablement plus présent

Granja Don Gabriel:

Présence principalement d'animaux à sérologie négative (4/5)

H: Le virus a circulé et il est possible qu'il soit encore présent

2/ Analyse ELISA anti-anticorps sur 25% des animaux des exploitation de bovins

Granja Pairumani:

Présence principalement d'animaux à sérologie positive (46/50)
dont 100% (3/3) des veaux de < 12 mois négatifs en anticorps

H: Le virus a probablement circulé il y a plus d'un an mais n'est probablement plus présent

Granja Don Gabriel:

Présence principalement d'animaux à sérologie négative (4/5)

H: Le virus a circulé et il est possible qu'il soit encore présent

Suite : BVDV-Screening de tous les animaux du troupeau

3/ *BVDV-Screening* de tous les animaux du troupeau

5 tests *BVDV-Screening*

- NC et NCS positifs en BVDV = **Contamination**
- IPC négatifs pour les échantillons = **Inhibiteurs** de PCR au sein des échantillons
- Fonctionnement occasionnel du kit *BVDV-Screening* et courbes anormales = **Dégradation du kit**

Solutions envisagées

- Pour les problèmes de contamination:
 - Ne plus ajouter d'eau au NC
 - NCS extrait à partir de PBS
 - Ouvrir les autres aliquots du MIX dans une autre pièce
- Pour les problèmes d'inhibiteurs de PCR :
 - Dilution des ARN extraits
 - Dilution des pools avant extraction
 - Doubler la quantité d'IPC
 - Extraction à partir de plasma
- Pour les problèmes de dégradation du kit:
 - Extraction sur du lait
 - Travail en individuel

Solutions envisagées

- Pour les problèmes de contamination:
 - Ne plus ajouter d'eau au NC
 - NCS extrait à partir de PBS
 - Ouvrir les autres aliquots du MIX dans une autre pièce
- Pour les problèmes d'inhibiteurs de PCR :
 - Dilution des ARN extraits
 - Dilution des pools avant extraction
 - Doubler la quantité d'IPC
 - Extraction à partir de plasma
- Pour les problèmes de dégradation du kit:
 - Extraction sur du lait
 - Travail en individuel

Solutions envisagées

- Pour les problèmes de contamination:
 - Ne plus ajouter d'eau au NC
 - NCS extrait à partir de PBS
 - Ouvrir les autres aliquots du MIX dans une autre pièce
- Pour les problèmes d'inhibiteurs de PCR :
 - Dilution des ARN extraits
 - Dilution des pools avant extraction
 - Doubler la quantité d'IPC ✓
 - Extraction à partir de plasma ✓
- Pour les problèmes de dégradation du kit:
 - Extraction sur du lait
 - Travail en individuel

Solutions envisagées

- Pour les problèmes de contamination:
 - Ne plus ajouter d'eau au NC
 - Ouvrir les autres aliquots du MIX dans une autre pièce
 - NCS extrait à partir de PBS
- Pour les problèmes d'inhibiteurs de PCR :
 - Dilution des ARN extraits
 - Dilution des pools avant extraction
 - Doubler la quantité d'IPC
 - Extraction à partir de plasma
- Pour les problèmes de dégradation du kit:
 - Extraction sur du lait
 - Travail en individuel

5 tests *BVDV-Screening*

- NC et NCS positifs en BVDV = Contamination
- IPC négatifs pour les échantillons = Inhibiteurs de PCR au sein des échantillons
- Fonctionnement occasionnel du kit *BVDV-Screening* = Dégradation du kit

2 tests *Fast-IPI*

- IPC négatifs pour les contrôles et pour les échantillons = **Problème d'IPC**

5 tests *BVDV-Screening*

- NC et NCS positifs en BVDV = Contamination
- IPC négatifs pour les échantillons = Inhibiteurs de PCR au sein des échantillons
- Fonctionnement occasionnel du kit *BVDV-Screening* = Dégradation du kit

2 tests *Fast-IPI*

- IPC négatifs pour les contrôles et pour les échantillons = **Problème d'IPC**

Solution envisagée: Combiner l'IPC du kit *BVDV-Screening* au kit *Fast IPI*

5 tests *BVDV-Screening*

- NC et NCS positifs en BVDV = Contamination
- IPC négatifs pour les échantillons = Inhibiteurs de PCR au sein des échantillons
- Fonctionnement occasionnel du kit *BVDV-Screening* = Dégradation du kit

2 tests *Fast-IPI*

- IPC négatifs pour les contrôles et pour les échantillons = Problème d'IPC

1 test combinant les deux kits

- Pas d'amplification = La combinaison des 2 kits n'est pas possible

Echec de :

- 5 tests *BVDV-Screening*

Echec de :

- 5 tests *BVDV-Screening*
 - 2 tests *Fast IPI*

Echec de :

- 5 tests *BVDV-Screening*
 - 2 tests *Fast IPI*
- 1 test combinant les deux kits

L'hypothèse de dégradation des kits moléculaires dû à une décongélation importante subit lors du trajet Belgique – Bolivie

→ l'élaboration d'un kit de détection moléculaire pouvant se conserver à température ambiante sera tentée en Belgique.

→ Passage aux analyses immunologiques

4/ Analyses immunologiques complémentaires

a) Détection des animaux à sérologie négative au sein des exploitations

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

4/ Analyses immunologiques complémentaires

a) Détection des animaux à sérologie négative au sein des exploitations

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

b) Observation de l'évolution de la sérologie des animaux de la Granja de Don Gabriel, 3 à 4 semaines plus tard

→ **Pas d'évolution: le virus ne semble plus être présent**

4/ Analyses immunologiques complémentaires

- a) Détection des animaux à sérologie négative au sein des exploitations

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

- b) Observation de l'évolution de la sérologie des animaux de la Granja de Don Gabriel, 3 à 4 semaines plus tard

→ **Pas d'évolution: le virus ne semble plus être présent**

- c) Détection de l'antigénémie des vaches négatives en anticorps dans les deux exploitations

→ **toutes les vaches sont négatives en antigènes : ces animaux ne sont pas des animaux IPI**

5/ Analyses immunologiques et moléculaires réalisées sur les lamas

- **Analyse immunologiques**
 - ELISA anti-anticorps
9 sur 10 sont négatifs en anticorps
 - ELISA anti-antigènes
10 sur 10 sont négatifs en antigènes
- **Analyses moléculaires** réalisées en Bolivie sur les échantillons de sang de lamas ont également été en échec.

6/ Analyses *Fast-IPI* supplémentaires réalisées en Belgique

But:

- 1) Détecter si les veaux et les taureaux à sérologie négative de la Granja Pairumani sont des animaux IPI
- 2) Voir si le kit *Fast-IPI* fonctionne sur les lamas

Résultats:

- aucune contamination
- IPC positif pour tous
- Tous négatif en BVDV

Les deux exploitations de bovins contiennent des animaux sains dont la plupart sont immunisés contre le BVDV.

7/ Kit de détection moléculaire se conservant à température ambiante

a) Lyophilisation des composantes du kit *BVDV-Screening*

Composantes	Lyophilisation
Master MIX (Taq + dNTP)	Pas possible car contenue dans du glycérol
Reverse transcriptase	Pas possible car contenue dans du glycérol
Séquences BVDV (primers + sonde)	OK mais perte de 4 Ct
EPC	OK
IPC	OK mais perte de 4 à 6 Ct

b) « *Illustra Ready To Go RT-PCR Beads* » → **Pas d'amplification**

Conclusions

1/Le virus est présent chez les bovins et lamas de Cochabamba et de La Paz;

Conclusions

- 1/Le virus est présent chez les bovins et lamas de Cochabamba et de La Paz;
- 2/ L'implémentation des méthodes de détection est possible d'un point de vue infrastructure et main d'œuvre, mais est entravée par les conditions de conservation strictes des kits moléculaires;

Conclusions

- 1/ Le virus est présent chez les bovins et lamas de Cochabamba et de La Paz;
- 2/ L'implémentation des méthodes de détection est possible d'un point de vue infrastructure et main d'œuvre, mais est entravée par les conditions de conservation strictes des kits moléculaires;
- 3/ Les deux exploitations de bovins ne présentaient plus le BVDV mais avait été infectés préalablement;

Conclusions

- 1/ Le virus est présent chez les bovins et lamas de Cochabamba et de La Paz;
- 2/ L'implémentation des méthodes de détection est possible d'un point de vue infrastructure et main d'œuvre, mais est entravée par les conditions de conservation strictes des kits moléculaires;
- 3/ Les deux exploitations de bovins ne présentaient plus le BVDV mais avait été infectés préalablement;
- 4/ Le test ELISA anti-anticorps fonctionne sur les échantillons de plasma de lamas;

Conclusions

- 1/ Le virus est présent chez les bovins et lamas de Cochabamba et de La Paz;
- 2/ L'implémentation des méthodes de détection est possible d'un point de vue infrastructure et main d'œuvre, mais est entravée par les conditions de conservation strictes des kits moléculaires;
- 3/ Les deux exploitations de bovins ne présentaient plus le BVDV mais avait été infectés préalablement;
- 4/ Le test ELISA anti-anticorps fonctionne sur les échantillons de plasma de lamas;
- 5/ La lyophilisation des séquences BVDV, de l'EPC et de l'IPC est possible avec toutefois des pertes de sensibilité;

Conclusions

- 1/ Le virus est présent chez les bovins et lamas de Cochabamba et de La Paz;
- 2/ L'implémentation des méthodes de détection est possible d'un point de vue infrastructure et main d'œuvre, mais est entravée par les conditions de conservation strictes des kits moléculaires;
- 3/ Les deux exploitations de bovins ne présentaient plus le BVDV mais avait été infectés préalablement;
- 4/ Le test ELISA anti-anticorps fonctionne sur les échantillons de plasma de lamas;
- 5/ La lyophilisation des séquences BVDV, de l'EPC et de l'IPC est possible avec toutefois des pertes de sensibilité;
- 6/ Aucune méthode de détection unique efficace, rapide et peu coûteuse existe pour évaluer le statut BVDV d'une exploitation

Perspectives

- Les contaminations auraient probablement pu être évitées si différentes pièces avaient été à disposition pour les analyses moléculaires;

Perspectives

- Les contaminations auraient probablement pu être évitées si différentes pièces avaient été à disposition pour les analyses moléculaires;
- Les tests ELISA anti-antigènes et les tests moléculaires pourraient être testés sur des lamas infectés ou inoculés par le BVDV;

Perspectives

- Les contaminations auraient probablement pu être évitées si différentes pièces avaient été à disposition pour les analyses moléculaires;
- Les tests ELISA anti-antigènes et les tests moléculaires pourraient être testés sur des lamas infectés ou inoculés par le BVDV;
- La combinaison des billes RT-PCR et le kit *BVDV-Screening* partiellement lyophilisé pourrait fonctionner par des analyses ultérieures sur la concentration en sels des billes, la température d'activité optimales de la Taq, le design des primers, etc.

Merci pour votre attention !