



Le diagnostic du BVD - Cas particulier de la PCR

Le virus de la diarrhée virale bovine, également responsable de la maladie des muqueuses, fait actuellement l'objet de réflexions au niveau de la communauté vétérinaire et sanitaire.

Cette lettre a pour but d'apporter quelques éléments de réflexion supplémentaires en présentant notamment l'intérêt de la méthode PCR, sur laquelle nous travaillons maintenant depuis 3 ans, pour le diagnostic et le suivi en élevage. ■

EDITO

Il nous a semblé important de réaliser ce premier numéro spécial pour faire un point sur l'utilisation de la RT-PCR dans le cadre du diagnostic du virus BVD. AdiaGène propose depuis plus d'un an un kit RT-PCR BVD qui a pu faire ses preuves dans de nombreux laboratoires ou dans le cadre d'une validation avec les GDS bretons. La PCR a ici, plus que pour de nombreuses autres applications, apporté une grande avancée dans la gestion des élevages atteints. Nous allons proposer dans les prochaines semaines une version RT-PCR temps réel de ce kit à destination des laboratoires équipés en PCR temps réel. Comme vous avez pu le voir dans notre numéro 5 de septembre 2002, la PCR est aussi une technique qui continue son évolution.

Les deux technologies vont pouvoir cohabiter sans problème, leur performance en spécificité et sensibilité étant identiques. Le choix de l'une ou l'autre sera fait par le laboratoire en fonction d'une étude de coût par rapport au volume d'analyse. En fait la RT-PCR temps réel sera intéressante pour la réalisation de séries importantes d'analyses.

À noter un point important dans ce numéro sur les droits de propriété industrielle liés à l'utilisation de la PCR simple ou temps réel. L'innovation est primordiale et nous devons tous veiller à ce qu'elle soit financée pour ne pas hypothéquer notre avenir. Nous nous tenons à votre disposition pour en discuter et vous apporter toutes les garanties.

Bonne lecture à tous,

Dr Bruno Chevallier,
P.D.G. D'AdiaGène

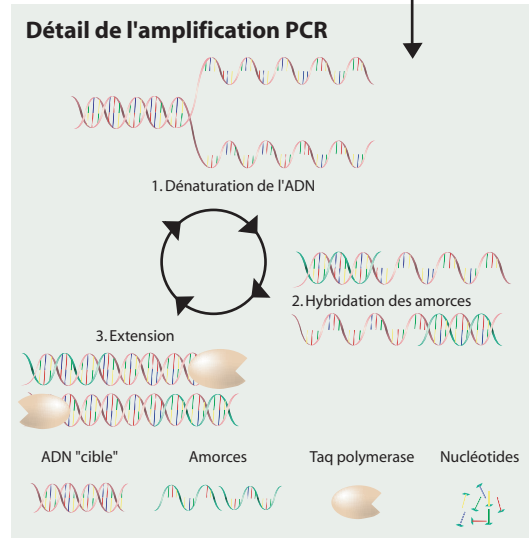
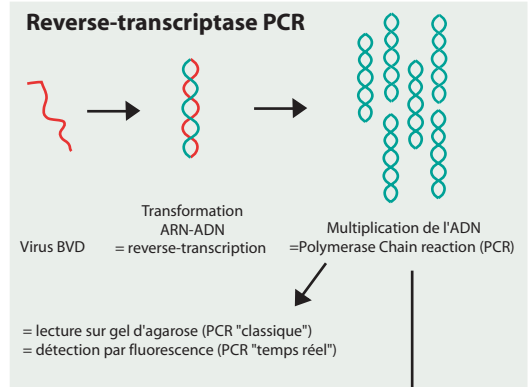
Le BVDV est un virus à ARN à l'origine de la maladie des muqueuses chez les bovins générant des pertes économiques importantes dans les élevages. De nombreux pays ont mis en place des plans d'éradication de cette maladie, impliquant une parfaite gestion des animaux infectés, ceux-ci devant être dépistés avec une grande précocité et fiabilité. L'infection prénatale d'un veau entre le 60^{ème} jour et 120^{ème} jour de gestation conduit à la naissance d'un animal infecté permanent immunotolérant (IPI), extrêmement contagieux. Le dépistage précoce de ces animaux IPI est essentiel dans le cadre des plans d'éradication.

Méthodes de diagnostic

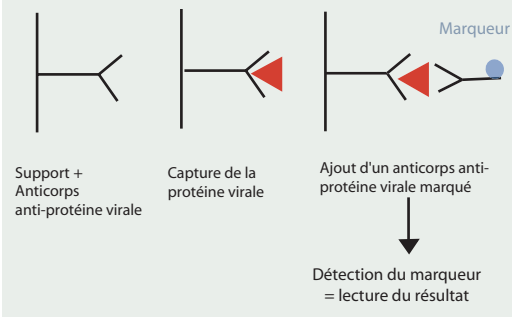
Les méthodes de diagnostic du virus BVD habituellement utilisées en laboratoire sont de deux ordres :

- soit on détecte le virus, et dans ce cas on utilise l'antigénémie, la culture virale ou la PCR,
- soit on détecte les anticorps sanguins par des technologies ELISA.

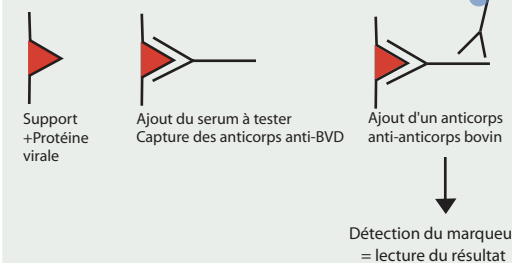
La première catégorie de méthodes permet de détecter les animaux porteurs du virus à un instant t qu'ils soient IPI ou infecté transitoire. Il



Antigénémie P80



Sérologie



faut donc effectuer le bon prélèvement au bon moment. Dans le cas de la PCR, de nombreux prélèvements sont utilisables comme les écouillons nasaux, le lait, les fèces, le sang et le serum et le lait.

La sérologie ELISA, quant à elle, ne permet pas de détecter les animaux IPI de façon directe car ceux-ci sont séronégatifs.

L'antigénémie n'est capable de détecter des animaux infectés que plusieurs semaines après leur naissance, et la culture virale reste une technique longue et difficile. La PCR a apporté un avantage considérable en autorisant la détection de très jeunes animaux IPI et la possibilité d'utiliser des pools de prélèvements de plusieurs dizaines d'animaux.

Etude des GDS bretons : Utilisation de la PCR sur lait de grand mélange

En Bretagne, un plan de maîtrise collective du virus BVD est en place depuis plus de 2 ans. Afin d'évaluer le statut sérologique de chaque troupeau, des recherches d'anticorps antiBVD sont régulièrement réalisées sur l'ensemble des troupeaux laitiers. La prévalence des troupeaux contenant un fort pourcentage de vaches séropositives vis à vis du BVD est de 35%. Parmi ces troupeaux, il est intéressant de connaître la fréquence et de repérer ceux qui détiennent des vaches excrétrices de virus.

Afin d'évaluer la technique RT-PCR vis à vis du lait de grand mélange, l'UBGDS et l'UMR ENVN-INRA Gestion de la santé animale ont suivi 88 troupeaux. Des analyses ont été réalisées en aveugle selon les modalités suivantes : RT-PCR sur le lait de grand mélange dans 3 laboratoires (dont Adiagène), et sérologie et antigénémie sur sang ou serum des vaches ayant contribué à fournir le lait du tank.

Les résultats sont les suivants : la sensibilité est de 100% quelle que soit la technique. La spécificité varie de 98 à 100%. De plus, des dilutions successives de lait RT-PCR positif ont montré une détectabilité permettant de repérer une vache excrétrice sur 400 !

Suite à cette étude, l'UBGDS préconise 2 PCR à 3 mois d'intervalle sur le lait de tank pour rechercher ou affirmer l'absence d'IPI parmi les troupeaux laitiers. Les résultats de cette étude seront prochainement publiés.

PCR « classique » versus PCR temps réel

Le principe de la PCR temps réel est identique à la PCR dite « classique » (cf schéma au recto) mais la multiplication de l'ADN est en effet visible en temps réel grâce à une détection par fluorescence.

Les performances des deux techniques en terme de sensibilité ou spécificité sont souvent similaires et identiques pour BVD. Le choix de l'une ou l'autre se fera principalement sur le nombre d'échantillons à tester : la PCR temps réel est l'outil idéal pour les grandes séries. (plusieurs centaines par jour)

	PCR "classique"	PCR "temps réel"
Coût d'acquisition de la machine PCR	5 à 10 000 euros	40 à 100 000 euros
Temps de rendu de résultat pour 96 échantillons (durée totale avec temps technicien)	Traitement des prélèvements : 2h Extraction de l'ADN automatisée : 2h PCR : 2h Electrophorèse : 1h Exploitation des résultats : 1h TOTAL : 8h	Traitement des prélèvements : 2h Extraction de l'ADN automatisée : 2h PCR : 2h Exploitation des résultats : 1h30 TOTAL : 7h30
Avantages	- De nombreux kits standardisés existent aujourd'hui - Plus simple pour l'exploitation des résultats et plus économique	- Risque de contamination par des produits amplifiés moindre - Automatisation de la lecture - Quantification relative
Inconvénients	- Utilisation éventuelle du BET - Séparation de l'amplification et de la lecture	- Coût élevé du matériel et des réactifs - Formation du personnel

Dans le cas de la recherche du virus BVD, les deux techniques PCR sont sensiblement équivalentes. La notion de quantification reste relative : dans l'absolu, on peut imaginer effectuer une distinction selon la charge virale et donc différencier IPI et infectés transitoires. Cette notion est cependant à manipuler avec précaution : comment quantifier le virus dégradé lors de l'acheminement et quel est le seuil significatif.

A performances égales, chaque laboratoire peut trouver aujourd'hui l'outil PCR qui lui convient en fonction de ses exigences de coûts, de volume ou d'automatisation.

Solenn Vaillant-Bougis

La RT-PCR BVD dans les laboratoires

Adiagène commercialise depuis fin 2002 le kit Adiavet® BVD en PCR « simple », qui a été utilisé avec succès dans l'étude des GDS bretons. Une version en kit PCR temps réel vient d'être développée et sera proposée aux laboratoires dans les prochaines semaines.

Ces tests sont validés sur de nombreux prélèvements : serum, sang, feces, lait et écouvillons nasaux et détectent les virus BVD de type 1 et 2.

PCR : Attention licence !

La PCR et la PCR temps réel sont des techniques dont le brevet est détenu par Hoffmann La Roche. Tout laboratoire proposant les techniques PCR ou RT-PCR doit posséder une licence délivrée par Hoffmann et payer des redevances (environ 5% du prix final de l'analyse). Les réactifs d'Adiagène pour la PCR et PCR temps réel sont sous licence, comme vous pouvez le constater sur le courrier ci-joint. Un laboratoire utilisant ces réactifs n'aura pas à acquérir de licence ni à payer de redevances pour ces analyses.