

DÉTECTION DES PARVOVIRUS DES PALMIPÈDES PAR PCR EN TEMPS RÉEL



RÉSUMÉ

Un test de PCR en temps réel permettant la détection sensible et spécifique des parvovirus des palmipèdes (Derzsy et Parvovirus du canard de barbarie - DPV) ainsi que le typage du virus de Derzsy Sauvage/Vaccinal (Hoekstra) a été mis au point.

La souche Derzsy contenue dans le vaccin Parvokan® a été suivie sur deux lots de canards de barbarie. La souche est retrouvée en grande quantité dans la rate dans les jours suivants la 2nde injection. Des résultats similaires ont été obtenus sur un lot de canard mulard.

Une circulation de virus sauvage (DPV chez le barbarie et Derzsy chez le mulard) a également été mise en évidence dans les élevages testés.

INTRODUCTION

Les parvoviroses des palmipèdes sont dues à deux virus distincts, le parvovirus du canard de barbarie (DPV) et le virus de la maladie de Derzsy. Un nouvel outil de diagnostic a été développé, il permet de détecter simultanément au cours d'une seule analyse le virus de la maladie de Derzsy et le DPV, et il a été récemment associé à un typage différenciant les souches sauvages de virus de Derzsy de la souche vaccinale (Hoekstra) utilisée dans les vaccins Palmivax® et Parvokan® (Merial).

Ce test utilise une technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative qui permet d'amplifier spécifiquement *in vitro* un fragment d'ADN tout en visualisant en temps réel cette amplification grâce à la fluorescence émise par une sonde spécifique. Cette méthode permet de détecter de très faibles quantités de virus de façon très spécifique. Le test Parvo-Palmipèdes a été conçu en associant une amplification commune aux deux virus (DPV et Derzsy) à deux sondes spécifiques émettant chacune une fluorescence caractéristique afin de typer la souche amplifiée. Le test de typage Derzsy sauvage/vaccinal est basé sur le même principe. Ces 2 tests utilisant la PCR en temps réel ont été mis en œuvre pour évaluer la prise vaccinale (valence Derzsy) ainsi que la circulation de virus sauvage en élevage. Une première étude a été réalisée sur le canard de barbarie et une seconde est en cours sur le canard mulard.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Spécificité du test Parvo-Palmipèdes

- Aucune détection des parvovirus canins (CPV1 et CPV2), félin (FPV) ou de rat (KRV).
- Aucun croisement de signal dans la détection du DPV et du virus de la maladie de Derzsy
- Souches de références et de terrain détectées:
 - Parvo barbarie: DPV 89384, DPV 89139 (souches fournies par J.-P. Picault, AFSSA, Ploufragan, France). Le processus d'inactivation de la souche DPV GM contenue dans le Parvokan® modifie l'ADN viral au point de le rendre indétectable par le test PCR développé.
 - Derzsy souche Hoekstra : vaccins Palmivax® et Parvokan® (Merial).
 - Derzsy souche sauvage : échantillons de terrain (4 rates provenant de 4 élevages distincts) prélevés sur canards mulards atteints de nanisme bec court (vérification par PCR + séquençage).
- Résultats négatifs sur échantillons prélevés sur des canards sans signes cliniques ni antécédents de parvovirose sur le site d'élevage (30 rates provenant de 2 élevages distincts).

Typage du virus de Derzsy Hoekstra/Sauvage

➢ Amplification et séquençage du gène de la VP2 du virus de Derzsy:

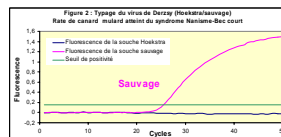
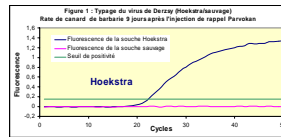
- Souche sauvage: 4 échantillons prélevés dans 4 élevages différents lors d'épisodes cliniques de maladie de Derzsy sur canards mulards.
- Souche vaccinale Hoekstra: vaccins Palmivax® et Parvokan® (Merial).

➢ Analyse et comparaison des séquences :

14 polymorphismes (Sauvage/vaccinal) sur le gène de la VP2 conduisant à 5 polymorphismes protéiques.

➢ Design d'un test de Typage Derzsy Sauvage/Hoekstra :

PCR en temps réel (Figures 1 et 2).



Seuil de détection du test

- Clonage des séquences cibles des deux virus.
- Dosage et dilutions des plasmides.
- Évaluation du seuil de détection : (selon les recommandations de la pharmacopée européenne).
 - Gamme de dilutions de plasmide (faibles nombres de copies).
 - 8 tests pour chaque dilution.
 - Mesures répétées au cours de 3 expériences indépendantes (au total 24 mesures pour chaque dilution).
 - Analyse statistique: Probit.

Seuil de détection à 95% < 5 copies de génome viral par analyse

Matériel biologique

- 2 élevages conventionnels de canards de barbarie. Vaccination des canetons : Parvokan® (J1+J15).
- 1 élevage conventionnel de canards mulards (étude en cours sur 7 autres élevages). Vaccination des canetons: Palmivax® (J1+J15).
- 4 types de prélèvements : rate, cœur, nerf, écouvillon cloacal. Expédition directe au laboratoire ou congélation préalable.

RÉSULTATS Évaluation de la prise vaccinale (valence Derzsy) et circulation de virus sauvage en élevage conventionnel

Canard de barbarie

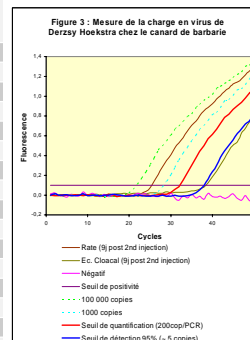
- Après la 1^{ère} injection de Parvokan®:
 - Détection du virus Derzsy (Hoekstra) dans une faible proportion d'échantillons (6/40 à J1; 7/40 à J11).
- Après la 2nde injection de Parvokan®.
 - Augmentation de la proportion d'échantillons positifs (Hoekstra) (33/36 à J24).
 - Organe le plus concentré en virus : rate (figure 3).
 - Faible charge virale (< seuil de quantification) dans les écouvillons cloacaux positifs (figure 3). Absence d'excrétion cloacale détectable à J70.
- Circulation de DPV (souche sauvage):
 - Ec. cloacaux positifs (4/10 à J1, 1/10 à J11 et 2/9 à J24).
 - Rates positives (4/10 à J1)
 - Aucun échantillon positif à J32 et J70.

Tableau 1 - Récapitulatif des résultats PCR obtenus dans 2 lots de canard de barbarie (élevages conventionnels)

Age de l'animal	Nature du prélèvement	Positif DPV*	Positif Derzsy*	Typage Derzsy (nb d'échantillons typés)	Charge virus Derzsy ** (nb d'échantillons quantifiés)
1 jour	Ec. cloacal	4/10	2/10	Hoekstra (2)	< seuil de quantification
	Nerf	0/10	0/10	-	-
	Muscle	0/10	0/10	-	-
11 jours	Rate	4/10	4/10	Hoekstra (4)	< seuil de quantification
	Ec. cloacal	1/10	1/10	Hoekstra (1)	< seuil de quantification
	Nerf	0/10	2/10	Nd.	< seuil de quantification
24 jours	Muscle	0/10	2/10	Nd.	< seuil de quantification
	Rate	0/10	2/10	Hoekstra (1)	< seuil de quantification
	Ec. cloacal	2/9	6/9	Hoekstra (2)	< seuil de quantification
32 jours	Nerf	0/9	9/9	Nd.	< seuil de quantification
	Muscle	0/9	9/9	Nd.	< seuil de quantification
	Rate	0/9	9/9	Hoekstra (3)	21100 – 1033900 (8)
70 jours	Ec. cloacal	0/6	2/6	Nd.	< seuil de quantification
	Nerf	0/6	4/6	Nd.	330600 (1)
	Muscle	0/6	4/6	Hoekstra (1)	760300 (1)
70 jours	Rate	0/6	4/6	Hoekstra (1)	34200 (1)
	Ec. cloacal	0/20	0/20	-	-

* Nb de positifs / Nb de sujets testés
Nd. : non déterminé

** Nb de copies de génome viral / Prise d'essai



Canard mulard

- Aucune détection de la souche Hoekstra après la 1^{ère} injection.
- Détection de faibles charges de souche Hoekstra (non quantifiables) dans la rate et les écouvillons cloacaux après la 2nde injection.
- Circulation de virus de Derzsy (souche sauvage): Ec. cloacaux positifs (3/6 à J7)

Tableau 2 – Résultats préliminaires (PCR) obtenus chez 1 lot de canards mulards (élevage conventionnel).

Age de l'animal	Nature du prélèvement	Positif Derzsy*	Typage Derzsy	Positif DPV*
1 jour	Ec. cloacal	0/5	-	0/5
	Rate	0/1	-	0/1
7 jours	Ec. cloacal	3/6	Sauvage	0/6
21 jours	Rate	1/1	Hoekstra	0/1
	Ec. cloacal	5/5	Hoekstra	0/5

* Nombre de positifs / nombre de sujets testés.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

➢ Prise vaccinale (valence Derzsy) :

- Quantité importante de virus dans la rate après la 2nde injection.
- Possibilité de suivre la prise vaccinale en Derzsy.

➢ Circulation de virus sauvage dans des lots asymptomatiques

- Détection de faibles charges des souches virales sauvages (DPV chez le barbarie et Derzsy chez le mulard) dans les écouvillons cloacaux dans les premières semaines suivant la mise en place.

➢ Diagnostic des parvoviroses des palmipèdes quel que soit le statut vaccinal des animaux.

➢ PERSPECTIVES :

Évaluer l'intérêt de la détection de faibles charges de virus sauvage en tant que nouvel indicateur de suivi d'élevage (en cours sur le canard mulard).