

PCR directe pour la détection du génome du virus de la peste porcine africaine à partir de prélèvements de sang sur buvard

Vincent MICHAUD (1), Linda DIXON (2), Luis ROMERO (3), Marie-Frédérique LE POTIER (4),
François ROGER (1), Emmanuel ALBINA (1)

(1) CIRAD, Département élevage et médecine vétérinaire,

TA 30/G, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5 (F)

(2) Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF (UK)

(3) Subdirección General de Sanidad Animal (SGSA-MAPA), C/ Corazón de María, 8 ; 4, Madrid 28071

(4) AFSSA, Laboratoire d'études et de recherches avicoles et porcines, BP 53, 22440 Ploufragan (F)

PCR directe pour la détection du génome du virus de la peste porcine africaine à partir de prélèvements de sang sur buvard

La peste porcine africaine est une maladie infectieuse très contagieuse due à un virus à ADN double brin, appartenant à la famille des *Asfarviridae*, genre *Asfivirus*. Endémique en Afrique du Sud et en Sardaigne, épizootique en Afrique de l'ouest et à Madagascar et représentant une menace permanente pour l'Europe, la peste porcine africaine constitue un problème sanitaire majeur pour la filière porcine. Un des enjeux du diagnostic, en particulier pour les pays africains, est de pouvoir diagnostiquer rapidement la présence du virus sur des prélèvements faciles à réaliser et dont la conservation ne nécessite pas d'équipements spéciaux. Le test que nous décrivons ici répond à ces exigences. Il s'agit d'un test de PCR directe sur prélèvement de sang effectué sur papier buvard. Après imprégnation, le buvard est séché puis un fragment d'environ 5 mm² est mis directement dans un tube PCR, dans lequel on ajoute le mélange réactionnel. Après amplification, les amplicons sont visualisés sur gel d'agarose. Ce test permet de détecter jusqu'à l'équivalent de 0,13 dose infectieuse virale ou encore l'équivalent de 1,3 copie du génome viral. Appliquée sur porcs infectés expérimentalement, la méthode a donné des résultats homogènes avec ceux obtenus sur du sang prélevé en tube contenant un anticoagulant. La validation du test doit maintenant se poursuivre sur de grands échantillons prélevés en Afrique.

Direct PCR for the detection of African swine fever virus genome from dried blood filter papers

African swine fever is a highly contagious disease of swine caused by a double-strand DNA virus that belongs to the *Asfarviridae* family, *Asfivirus* genus. The disease is endemic in South-Africa and Sardinia, epidemic in West-Africa and Madagascar and remains a major sanitary threat for the swine industry in Europe. There is actually a need, particularly in African countries, for an easy and rapid diagnostic tool for the detection of the virus on live or dead animals. This tool should also take into account the problem of the samples' conservation. The test described herein provides an answer to these requirements. It is based on a direct PCR on blood dried filter papers. After soaking, the filter paper is dried and a piece of 5 mm² is cut and put into a PCR tube. Then the PCR mix is added and the reaction performed. Amplicons are detected on agarose gels. This test allows the detection of 0.13 tissue culture infectious doses or 1.3 corresponding genome copie. Using samples from pigs infected experimentally, we obtained homogeneous results between blood dried filter papers and the classical blood-sample tubes. The next step will be to continue the validation of the test on large samples collected on the field.

INTRODUCTION

La peste porcine africaine (PPA) est une maladie infectieuse très contagieuse classée dans la liste A des maladies de l'Office International des Epizooties (OIE). Elle est due à un virus à symétrie icosaédrique et à ADN double brin, proche des *Poxviridae*. Ce virus reste toutefois le seul représentant de la famille des *Asfarviridae* (African swine fever and related viridae), genre *Asfivirus* (PRINGLE, 1999). La maladie est endémique en Afrique du sud et suit un développement épidémique cyclique en Afrique de l'Ouest. Elle est un frein au développement économique de la filière porcine dans ces régions. En Europe, la maladie a été éradiquée à l'exception de la Sardaigne où elle demeure endémique. La récente ré-émergence de foyers de PPA au Portugal en 1999, montre que le risque sanitaire reste élevé pour l'Europe. Le diagnostic virologique de la PPA repose sur des techniques classiques de virologie ou peut être effectué par amplification génomique en chaîne (PCR). Un des points déterminants de la fiabilité du diagnostic est la qualité du prélèvement au moment du test. En Afrique, la conservation des prélèvements est un élément critique. Un test PCR à partir de prélèvements de sang effectués sur buvards a déjà été mis en œuvre pour le diagnostic de la PPA (GUY-GONZAGUE et al, 2003). Dans ce travail, nous apportons une simplification du protocole en proposant une PCR directe, sans extraction du matériel génétique et nous déterminons la détectabilité et la sensibilité de l'outil diagnostique ainsi proposé.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Echantillons

Des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) ont été prélevés à la veine jugulaire pour imprégner des bandes de papier buvard. Ces papiers buvards imprégnés ont servi aux contrôles négatifs de PCR et à l'établissement des gammes de détection du virus. Quatre porcs conventionnels ont été infectés expérimentalement par voie intramusculaire avec la souche E70 isolée en Espagne en 1970. Des prélèvements de sang sur tubes héparinés et sur buvards, ont été effectués le jour de l'épreuve infectieuse puis 3 et 6 jours après infection. Deux porcs ont été infectés expérimentalement par voie oronasale avec la souche E75 isolée en Espagne en 1975 et un autre porc a été placé au contact de ces 2 porcs infectés. Des prélèvements de sang sur buvards ont été effectués sur les trois porcs, le jour de l'épreuve, puis 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17 jours après infection.

Pour la constitution des contrôles positifs de PCR et l'établissement de gammes de détection, un plasmide de clonage en procaryote contenant le gène codant pour la protéine virale de capsid VP72 a été produit en culture bactérienne *in vitro* et quantifié. En outre, une souche virale de PPA (Afssa-Ploufragan) a été amplifiée sur culture *in vitro* de macrophages alvéolaires de porcs EOPS : le titre obtenu était de $10^{5,8}$ doses cytopathiques pour 50 % des cultures cellulaires infectées (DCP_{50}) par ml.

1.2. Préparation des buvards

Les papiers buvard utilisés étaient de marque Whatmann 3M (VWR, Fontenay-sous-Bois). Les buvards préparés à partir de sang de porcs EOPS ont été imprégnés au moment de l'euthanasie par exsanguination sous anesthésie générale. Pour constituer les gammes de détection sur buvards, le plasmide contenant la VP72 ou le virus ont été dilués sériellement de 10 en 10 et déposés à raison de 2 μ l sur un fragment de buvard d'environ 5 mm², imprégné du sang des porcs EOPS. Sur les porcs infectés, les buvards ont été imprégnés de sang après avoir pratiqué une légère incision de l'oreille.

1.3. Protocole PCR

Des fragments de buvards d'environ 5 mm² ont été directement et sans traitement préalable déposés dans des tubes PCR de 0,2 ml. Dans ces tubes, ont été ensuite ajoutés 80 μ l de milieu réactionnel de PCR contenant 31,25 pmol de chaque primer, 20 pmol de dNTP et 2,5 unités de polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq pol Pfu, Stratagene, Amsterdam). Dans une première approche, plusieurs paires d'amorces, y compris celle décrite dans le manuel des standards de l'OIE pour les tests diagnostiques et les vaccins (EATON, 2000), ont été comparées. La paire qui s'est révélée la plus adaptée pour l'objectif visé a été définie au laboratoire. Elle correspondait à une amorce sens : 5'-TCggAgATgTTCCAggTAgg-3' et une amorce antisens : 5'-CgCAAAAggATTggTgAAT-3'. Le fragment alors amplifié est constitué de 346 paires de bases. Les conditions d'amplification étaient : 95°C, 5 min ; (95°C, 1 min ; 55°C, 30 s ; 72°C, 30 s)_{1 cycle} ; (95°C, 30 s ; 55°C, 30 s ; 72°C, 30 s)_{35 cycles} ; (95°C, 30 s ; 55°C, 30s ; 72°C, 4 min)_{1 cycle} et 72°C pendant 7 min pour l'élongation finale. Les amplicons ont été ensuite visualisés sur gel d'agarose.

2. RÉSULTATS

2.1. Détermination de la limite de détection de la VP72 d'origine virale ou plasmidique

Les résultats de la limite de détection de la VP72 sur buvards sont présentés en figure 1. Le protocole mis au point permet de détecter sur un fragment de buvard de 5 mm², jusqu'à 0,13 DCP_{50} et jusqu'à 1,3 copie de gène codant pour la VP72.

2.2. Application sur des prélèvements buvards provenant de porcs infectés

La détection du génome viral a été effectuée à partir de sang de porcs infectés par le virus PPA par voie intramusculaire et prélevés en parallèle sur anticoagulant et sur buvard. Les résultats obtenus sont détaillés dans le tableau 1. Tous les prélèvements réalisés avant l'infection sont négatifs. A l'opposé, tous les prélèvements testés trois jours après l'infection sont positifs. Six jours après infection, deux buvards sur trois testés sont positifs. Un seul prélèvement de sang sur anticoagulant a été testé à 6 jours post-infection et s'est avéré être négatif.

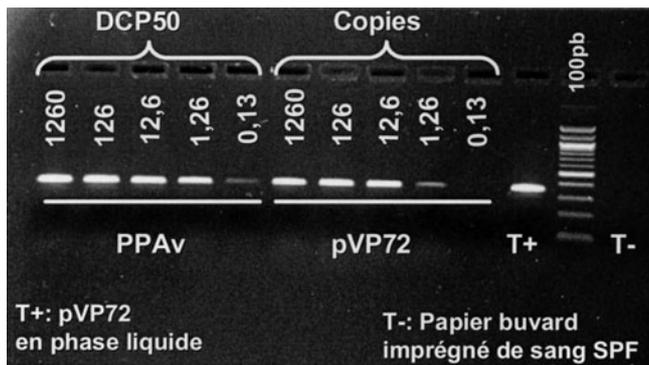


Figure 1 - Détermination de la détectabilité de la réaction de PCR sur buvards imprégnés de sang et reconstitués avec soit du virus infectieux (PPAv) soit du plasmide contenant le gène codant pour la protéine virale VP72 (pVP72). L'avant dernière ligne correspond au contrôle de poids moléculaire (100 bases)

Tableau 1 - Résultats de la détection du génome du virus PPA à partir de sang prélevé sur porcs infectés expérimentalement par voie intramusculaire. Les sangs ont été prélevés en parallèle sur anticoagulant (sang) ou sur buvard. (NP = non prélevé)

Jours post-infection	0		3		6	
	Buvard	Sang	Buvard	Sang	Buvard	Sang
Porc 1	-	-	+	+	NP	-
Porc 2	-	-	+	NP	+	NP
Porc 3	-	-	+	+	+	NP
Porc 4	-	-	+	+	-	NP

La sensibilité de la détection du génome viral a été déterminée sur des buvards générés en cinétique après infection par voie oronasale. Les buvards des porcs infectés par voie oronasale deviennent positifs à partir du huitième jour après infection (tableau 2). Ils sont très positifs au 10 et 11^{ème} jours après infection puis le signal décroît mais reste positif jusqu'au 17^{ème} jour. Le porc contact ne se positive qu'au 9^{ème} jour, devient très positif au 11^{ème} jour puis non détectable à partir du 14^{ème} jour.

3. DISCUSSION

Le prélèvement de sang sur buvards trouve son intérêt pour deux types d'applications : la détection de protéines sériques, en particulier la détection d'anticorps pour le diagnostic des maladies infectieuses ou parasitaires (HOGREFFÉ et al, 2002, SORENSEN et al, 2002) ou la détection de

matériel génétique, en particulier pour le diagnostic de maladies génétiques à partir de l'ADN somatique (PAI et al, 1994, MAKOWSKI et al, 2003) ou la détection du génome d'agents infectieux d'origine virale (SPAGNUOLO-WEAVER et al, 1998, HATTERMANN et al, 2002,) ou parasitaire (DE ALMEIDA et al, 1998 ; CHAORATTANAKAWEE et al, 2003). Ce type de prélèvements, outre son utilisation pour le diagnostic, permet également d'étudier la diversité génétique des populations humaines (MAKOWSKI et al, 2003) ou des virus et des parasites (JIANG et al, 1999, PITCOVSKI et al, 1999).

Les résultats de cette étude montrent que le prélèvement de sang sur buvard peut être directement utilisé, sans traitement préalable, dans une réaction PCR pour le diagnostic de la peste porcine africaine. Le protocole mis en œuvre a fait preuve d'une excellente détectabilité (moins de une DCP₅₀). La discordance entre le nombre de DCP₅₀ et le nombre de copies de gène VP72 détectables sur buvard (rapport de 1 à 10) peut s'expliquer par le fait que les DCP₅₀ reflètent une activité biologique du virus et non le nombre de particules virales présentes. Aussi, il est probable que toutes les particules virales ne sont pas infectieuses alors qu'elles peuvent toutes fournir une copie du gène VP72 amplifiable par PCR. En outre, lors de la répllication *in vitro* et *in vivo* du virus, il est également possible que de l'ADN viral soit à l'état libre augmentant ainsi la détectabilité de la PCR par rapport à la détermination d'un effet biologique quantifié en DCP₅₀. En revanche, la détermination du nombre de copies du gène VP72 cloné en plasmide est plus exacte puisqu'elle se base sur une mesure de la quantité d'ADN total et sa traduction en nombre de molécules.

Le nouveau protocole proposé permet d'accroître la rapidité du diagnostic tout en éliminant les risques de contamination liés aux étapes d'extraction de l'ADN. En supprimant l'étape d'extraction de l'ADN à partir du sang séché sur buvard (PCR directe), le test est mis en œuvre plus rapidement et à moindre coût. Toutefois, la préparation des fragments de buvards d'environ 5 mm² requiert l'utilisation de matériels individuels autoclavables (pince et ciseaux). Ce mode de prélèvement présente un avantage essentiel en terme de rapidité d'obtention et de conservation avant l'analyse. En effet, Le prélèvement sur l'animal est rapide et nécessite une contention réduite augmentant le confort du préleveur et de l'animal. En revanche, il faut prévoir un temps de séchage de quelques minutes du buvard imprégné pour une conservation optimale et la réduction des risques d'intercontamination entre buvards lorsqu'ils sont assemblés pour leur expédition au laboratoire. Ainsi préparé, l'ADN présent dans le

Tableau 2 - Résultats de la détection du génome du virus PPA à partir de buvards imprégnés de sang de porcs infectés expérimentalement par voie oronasale

Jours post-infection	1	2	3	6	7	8	9	10	11	14	15	16	17
Porc infecté	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	+	+	+	++
Porc infecté	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	+	+	++	++
Porc contact	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	-	-	-	-

sang séché se conserve jusqu'à 3 mois à 30°C (GUY-GONZAGUE et al, 2003).

Sur un nombre limité de prélèvements de sang effectués en parallèle sur anticoagulant ou sur buvards, aucune différence notable n'a été observée au niveau de la sensibilité du diagnostic sur buvards. Nous observons que la détection du génome viral est plus précoce après infection par voie intramusculaire que par voie oronasale : 3 jours après infection dans le premier cas, contre 8 jours après infection dans le second cas. Les données de la littérature montrent que la virémie après infection par voie oro-nasale ou intramusculaire peut débuter entre 2 et 10 jours après infection et persister au-delà de 30 jours (HAMDY et DARDIRI, 1984 ; EDWARDS et al, 1985 ; EKUE et al, 1989). Le type de souche virale et la dose administrée, ainsi que les caractéristiques génétiques des porcs infectés influent sur ces paramètres. Enfin, le porc mis en contact avec les deux porcs infectés par voie oronasale, présente du virus dans le sang prélevé sur buvard, 24 heures après les deux premiers. Cette réponse rapide, compte tenu du délai de 8 jours qui a été observé sur les deux porcs infectés, est en faveur d'une contamination par aérosol de ce porc contact au moment de l'infection des deux autres porcs.

Les perspectives de développement de cette méthode reposent sur la validation de l'outil buvard pour la détection du virus sur de grands échantillonnages obtenus sur le terrain. L'outil sera également évalué sur buvards imprégnés sur tissu lésé (calque). La mise au point d'une détection quantitative du génome viral par PCR en temps réel à partir de prélèvements buvards sera également envisagée, comme cela a été fait pour le virus de l'hépatite B du canard (WANG et al, 2002). Par ailleurs, la possibilité de détecter à partir du même prélèvement, soit les anticorps, soit l'ADN viral, doit être explorée. Enfin, la mise au point d'une réaction de PCR différentielle peste porcine classique / peste porcine africaine à partir d'un seul prélèvement buvard présenterait un intérêt évident pour la gestion rapide des suspicions cliniques dans les pays indemnes d'une ou des deux maladies, ou le diagnostic différentiel rapide dans les pays où les deux maladies sont présentes.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée grâce au soutien financier de la Communauté Economique Européenne au travers du projet de recherche qualité de la vie n° QLRT-2000-02216.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHAORATTANAKAWEE S., NATALANG O., HANANANTACHAI H., NACHER M., BROCKMAN A., KRUDSOOD S., LOOAREESUWAN S., PATARAPOTIKUL J., 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69(1), 42-44.
- DE ALMEIDA P.P., NDAO M., VAN MEIRVENNE N., GEERTS S., 1998. *Acta Trop.* 70(3), 269-276.
- EDWARDS J.F., DODDS W.J., SLAUSON D.O., 1985. *Am. J. Vet. Res.*, 46(10), 2058-2063.
- EKUE N.F., WILKINSON P.J., WARDLEY R.C., 1989. *J. Comp. Pathol.* 100(2), 145-154.
- GUY-GONZAGUE M., ROGER F., ROUSSET D., RANDRIAMPARANY T., CRUCIERE C., 2003. *J. Applied Res. Vet. Sci.*, 1(2), in press.
- HAMDY F.M., DARDIRI A.H., 1984. *Am. J. Vet. Res.*, 45(4), 711-724.
- HATTERMANN K., SOIKE D., GRUND C., MANKERTZ A., 2002. *J. Virol. Methods.*, 104(1), 55-58.
- HOGREFE W.R., ERNST C., SU X., 2002. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9(6), 1338-1342.
- JIANG G., LIU R., DAUBENBERGER C.A., PLUSCHKE G., 1999. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 17(5), 294-297.
- MAKOWSKI G.S., NADEAU F.L., HOPFER S.M., 2003. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 33(3), 243-250.
- PAI J.T., TSAI S.F., HORNG C.J., CHIU P.C., CHENG M.Y., HSIAO K.J., WUU K.D., 1994. *Hum. Genet.*, 93(5), 488-493.
- PITCOVSKI J., SHMUELI E., KRISPEL S., LEVI N., 1999. *J. Virol. Methods.*, 83(1-2), 21-26.
- PRINGLE C.R., 1999. *Arch. Virol.*, 144(10), 2065-2070.
- SORENSEN T., SPENTER J., JALIASHVILI I., CHRISTIANSEN M., NORGAARD-PEDERSEN B., PETERSEN E., 2002. *Clin. Chem.*, 48(11), 1981-1986.
- SPAGNUOLO-WEAVER M., WALKER I.W., MCNEILLY F., CALVERT V., GRAHAM D., BURNS K., ADAIR B.M., ALLAN G.M., 1998. *Vet. Microbiol.*, 62(3), 207-215.
- WANG C.Y., GIAMBRONE J.J., SMITH B.F., 2002. *J. Clin. Microbiol.*, 40(7), 2584-2590.