

Validation de nouveaux tests de détection par RT-PCR en temps réel du génome du virus de la peste porcine classique

Mireille LE DIMNA (1), Gaëlle KUNTZ-SIMON (1), Yann LOUGUET (3),
Stéphanie BOUGEARD (2), Marie-Frédérique LE POTIER (1)

(1) AFSSA-LERAP, Unité Virologie Immunologie Porcines, BP53, 22440 Ploufragan
(2) AFSSA-LERAP, Unité Epidémiologie et Bien-être Porcin, BP53, 22440 Ploufragan
(3) DGAL, SDSABEA, 251 rue de Vaugirard, 75732 Paris CEDEX 15

mf.lepotier@ploufragan.afssa.fr

avec la collaboration technique de Gaëlle Hervé (1) et Dominique Braive (3)

Validation de nouveaux tests de détection par RT-PCR en temps réel du génome du virus de la peste porcine classique

Les dernières épidémies de peste porcine classique en Europe ont démontré que la clé du contrôle de la maladie était la détection précoce des animaux infectés et leur élimination. Il existe donc un besoin réel d'outils de diagnostic permettant cette détection précoce aussi bien sur sang que sur organes. Deux nouveaux kits de détection du génome viral PPC développés respectivement par LSI (TAQVET PPC) et par AdiaGène (ADIAVET CSF) ont été agréés pour utilisation en France suite à leur validation par le laboratoire national de référence. 189 échantillons ont servi à évaluer la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité et la robustesse de ces kits. Ces échantillons étaient des souches virales ou des prélèvements de porcs EOPS infectés expérimentalement ou de sangliers naturellement infectés. Une validation terrain a été réalisée sur 4690 échantillons de rate de sangliers collectés dans un cadre d'épidémiosurveillance en zone infectée. Tous les échantillons positifs en RT-PCR en temps réel étaient vérifiés par isolement viral. Parmi ces 4690 échantillons, 62 étaient positifs en RT-PCR en temps réel (PCR+) et 14 en isolement viral (IV+). Parmi les 48 (PCR+/IV-), 38 provenaient de sangliers sérologiquement positifs (ELISA+). Seuls trois sangliers étaient (PCR+/IV-/ELISA-) mais la détection de génome viral PPC a pu être confirmée en utilisant une autre RT-nested PCR. En résumé, ces nouveaux tests de RT-PCR en temps réel semblent avoir une valeur prédictive bien plus élevée que l'isolement viral qui est la méthode actuelle de référence.

Diagnosis validation of new real time RT-PCR kits for detection of classical swine fever virus

Several classical swine fever (CSF) epidemics in Europe during the last decade proved that the key control during an outbreak is the early identification of CSF infected animals and their elimination. There is therefore a real need for the availability of a diagnostic method permitting the early detection of infected pigs using blood or organs. During the last ten years, different RT-PCR tests have been described, generally focusing on the 5' non coding region. Viral RNA detection can be performed on blood samples collected on live animals as well as on organ samples. Two new real time RT-PCR kits developed by LSI (Taqvet CSF) and ADIAGENE (Adiavet CSF) obtained an agreement to be commercialised in France, after they had been validated by the CSF NRL. The different criteria assessed were: sensitivity, specificity, reproducibility and easy handling, using 189 different samples. These samples were either CSFV strains or organs collected from CSF experimental SPF infected pigs or naturally infected wild boars. A field validation was carried out on 4690 spleen samples collected from a survey on wildboars. All the positive samples in real time RT-PCR were checked by virus isolation (VI). Of these 4690 samples, 62 were found positive by real time RT-PCR, and 14 were VI positive. Out of the 48 (PCR+/VI-) samples, 38 were taken from serologically positive animals (ELISA+). Only 3 samples (PCR+/VI-/ELISA-) were found, but confirmed by other RT-nested PCR test. In summary, the new CSF real time RT-PCR assays seem to have a higher predictive value than the virus isolation assay which is the current diagnostic method.

INTRODUCTION

La démonstration de l'absence d'une maladie inscrite sur la liste A de l'OIE est en principe basée sur le contrôle de l'absence d'anticorps contre l'agent responsable, comme c'est le cas pour la peste porcine classique (PPC). Cette philosophie empêche toute vaccination, car de fait elle induirait des anticorps et pourrait donc laisser sous-entendre la présence « masquée » de l'agent pathogène. Pour éradiquer des virus à conséquence économique majeure comme celui de la fièvre aphteuse (FA) ou celui de la peste porcine classique, l'Union Européenne a progressivement arrêté la vaccination avant de l'interdire tout à fait et d'éliminer les animaux présents dans les foyers résiduels. Cette politique a été très efficace et les populations d'animaux domestiques sont maintenant totalement vierges de toute immunité vis-à-vis de ces virus. Cependant, pour la PPC, il existe des réservoirs de virus dans les populations de sangliers sauvages en France. Nous ne sommes donc pas à l'abri d'une réintroduction du virus dans les élevages soit par contact avec la faune sauvage, soit par des pratiques illégales d'introduction de porcs ou de produits de charcuterie en provenance de pays tiers non indemnes.

L'application stricte des méthodes de contrôle par abattage ainsi que la restriction appliquée aux mouvements d'animaux a conduit à un abattage massif de porcs dont la plupart n'était pas infectés lors de l'épizootie de 1997 aux Pays Bas, en Allemagne, en Italie et en Espagne. De même lors des épizooties de PPC en 2000, puis de FA en 2001 en Grande Bretagne, le nombre d'animaux abattus a été important, générant cette fois une réaction très négative de la part de l'opinion publique. Le recours à la vaccination est depuis envisagée en cas d'apparition de nouveaux foyers de PPC, elle est d'ores et déjà appliquée au sein des populations de sangliers sauvages infectés dans le Nord-Est de la France pour tenter de limiter la diffusion de la maladie et la contamination des élevages, mais toujours avec cette problématique de distinguer les animaux infectés de ceux vaccinés.

Une alternative serait de baser la démonstration de l'absence de maladie non plus sur l'absence d'anticorps mais sur l'absence de l'agent pathogène lui-même. Dans le cas particulier de la PPC, cette approche était difficile à mettre en œuvre encore récemment, car la mise en évidence du virus nécessitait la mise en œuvre de techniques de laboratoires comme l'amplification du virus ou la détection de l'antigène sur des coupes d'organes. Ces techniques lourdes et coûteuses n'avaient pas été détrônées par le développement de kits de détection antigénique par ELISA, qui montraient des défaillances aussi bien en détectabilité qu'en spécificité. L'arrivée des techniques d'amplification par PCR dans le courant des années 90 a permis de rechercher le génome viral mais il a fallu une dizaine d'années pour que les techniques décrites dans la littérature deviennent utilisables en diagnostic, c'est à dire que les problèmes de spécificité et de détectabilité soient résolus, comme par exemple avec la technique décrite par (McGoldrick et al., 1999). Cependant cette technique de RT-nested PCR restait difficile à délocaliser dans les laboratoires de routine en raison d'un risque non négligeable de contaminations.

Avec le développement de la technique de RT-PCR en temps réel, il est devenu envisageable de faire développer par des industriels des kits de robustesse et de spécificité suffisantes pour être utilisables en diagnostic de routine. L'objectif de cette présentation est d'expliquer la méthode que nous avons définie et appliquée en tant que Laboratoire National de Référence pour valider ces nouveaux kits de détection du génome du virus de la PPC, tout d'abord sur quelques panels d'échantillons connus puis à plus grande échelle en utilisant les échantillons récoltés lors des enquêtes d'épidémiologie des sangliers du Nord Est de la France.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Principe de la RT-PCR en temps réel

Les deux kits développés par LSI (TAQVET PPC) et Adia-gène (ADIAVET CSF) reposent dans un premier temps sur la transcription reverse (RT) de l'ARN du virus PPC en ADN complémentaire. L'ADNc obtenu est dans un second temps amplifié (PCR) par une ADN polymérase qui utilise des amorces et une sonde Taqman marquée, spécifique du virus PPC. Les deux réactions enzymatiques se font dans un seul tube. Le mélange réactionnel comporte en outre un contrôle interne spécifique d'un ARN présent dans les cellules porcines générant l'amplification d'un contrôle d'extraction et d'amplification dans tous les échantillons tissulaires négatifs.

1.2. Sélection des échantillons à utiliser pour la validation

1.2.1. Souches virales

Les souches virales PPC sélectionnées pour valider la détectabilité des kits de RT-PCR en temps réel sont des souches de référence ou des souches de terrain représentatives de différents génogroupes identifiés en Europe au cours des dernières décennies. Pour évaluer la spécificité de la détection, d'autres souches de pestivirus sont utilisées ainsi que des souches de familles virales différentes mais souvent présentes chez le porc (Tableau 1).

1.2.2. Échantillons de porcs ou sangliers

Les panels d'échantillons utilisés pour valider les kits sont composés d'organes prélevés sur des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) avant ou après infection par une souche du virus de la PPC. Ces organes ont été testés en parallèle par isolement viral, RT-nested PCR adaptée d'après Mc Goldrick et al (1999), et RT-PCR temps réel. En complément, des organes provenant de porcs d'élevage à statut négatif ont été ajoutés, ainsi que des organes de sangliers en provenance de zones infectées (Tableau 2).

1.2.3. Méthodologie d'agrément

Pour être agréé, le producteur de kit devait présenter un dossier (confidentiel) dans lequel il décrivait sa méthode et ses premiers résultats de validation de détectabilité des souches de PPC et de spécificité vis à vis des autres pestivirus.

Tableau 1 - Spécificité et détectabilité de la RT-PCR en temps réel sur un panel de souches virales

VIRUS	SOUCHE	GENOGROUPE	Titre viral (DCP50/ml)	Détection jusqu'à la dilution :
PPC	Alfort 187	1,1	10 ^{6.9}	10 ⁻⁷
	Brescia	1,2	10 ^{6.1}	10 ⁻⁴
	Diepholz	2,3	10 ^{5.7}	10 ⁻⁴
	Viesbeck	2,3	10 ^{7.1}	10 ⁻⁴
	Moselle 1	2,3	10 ^{5.5}	10 ⁻⁴
	Paderborn	2,1	10 ^{6.5}	10 ⁻⁴
	Eystrup	1,1	10 ^{6.7}	10 ⁻⁴
BDV	Aveyron	/	/	négatif
BVDV	C24 Oregon	/	/	négatif
BD/PRRS	Aveyron/Espagnol	/	/	négatif
BD/AUJ/PPV	Aveyron/75V19/NADL8	/		négatif

Tableau 2 - Constitution des panels

espèces	organes	souche	résultats	nombre	panel1	panel2	panel3	panel4
porc d'expérimentation	amygdale	circovirus	neg.	2			*	
	ganglions mésent.	circovirus	neg.	2			*	
	valvules iléocecales	circovirus	neg.	2			*	
	rein	CSFV (Eystrup)	positif	1		*	*	
			douteux	2		*	*	*
	rate	CSFV (Eystrup) CSFV (paderborn)	positif	1		*	*	*
			positif	4		*	*	*
	ganglions mésent. valvules iléocecales sang serum hyper immun. ganglions mésent. serum	/	neg.	2	*	*	*	*
			positif	3		*	*	*
			positif	3		*	*	*
			positif	1		*	*	*
			neg.	1		*	*	*
neg.			2	*	*	*	*	
neg.	1		*	*	*	*		
porc d'élevage	amygdale	CSFV (Moselle1)	positif	2		*	*	
	/	/	neg.	2		*	*	
	ganglions mésent.	/	neg.	4			*	*
	rate	/	neg.	3			*	*
sang	/	neg.	4			*		
sanglier	rate	CSFV	positif	9		*	*	
		CSFV	douteux	5	*	*	*	
	/	neg.	17	*	*	*		
rein	/	neg.	1	*				
surnageant	surnageant de culture	CSFV Alfort	positif /douteux	3	*	*	*	*
		CSFV Moselle1	positif/neg.	3	*	*	*	*
		CSFV Bas rhin	positif/neg.	3	*	*	*	*
		CSFV Eystrup	positif/neg.	3	*	*	*	*
		CSFV Brescia	positif	1	*	*	*	
		CSFV Visbeck	positif	1	*	*	*	
		CSFV Diepholz	positif	1	*	*	*	
		CSFV Paderborn	positif	1	*	*	*	*
		BDV (Aveyron)	neg.	1	*	*	*	*
		BVDV	neg.	1	*	*	*	*
	mélange de souches	BD/SDRP	neg.	1			*	*
	BD/AUJ/PPV	neg.	1			*	*	
				20	58	89	22	

Un premier panel d'échantillons composé de souches virales et de prélèvements d'organes, lui était ensuite proposé. S'il obtenait les résultats escomptés, le 2^{ème} panel lui était soumis et de même pour le 3^{ème} panel (Tableau 2). Certains échantillons sont répétés dans plusieurs panels; c'est notamment le cas des souches virales, ceci permet d'apprécier la reproductibilité des résultats obtenus, les mêmes échantillons étant analysés dans des conditions différentes. Un 4^{ème} panel de 22 échantillons sélectionnés parmi les précédents a été conçu pour la validation de la production de chaque nouveau lot, ce panel servant aussi aux essais interlaboratoires.

1.3. Validation sur le terrain

A partir du 1^{er} Octobre 2004, le premier kit agréé (Taqvet LSI) a été utilisé dans le cadre de la surveillance des deux foyers de PPC chez les sangliers sauvages. Ces deux foyers dits de Thionville et des Vosges du Nord font l'objet des mêmes modalités de suivi sérologique et virologique systématique, avec un prélèvement de sang et de rate sur chaque sanglier abattu. Entre le 1^{er} Octobre 2004 et le 1^{er} avril 2005, 4690 échantillons de rate ont été analysés par RT-PCR en temps réel dans deux laboratoires départementaux (Meuse et Moselle). Parmi ces 4690 échantillons, 120 ont été testés à la fois en isolement viral et par RT-PCR en temps réel. Sur cette même population, 3646 sangliers ont fait l'objet d'une recherche d'anticorps sériques et de génome viral sur rate, tous les prélèvements de rate positifs en RT-PCR temps réel étant ensuite vérifiés par isolement viral sur culture cellulaire, selon la méthode décrite dans le manuel de diagnostic de l'OIE.

1.4. Analyses des données

Les performances de l'isolement viral et de la RT-PCR en temps réel ont été estimées en termes de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative selon la méthode décrite par (Rumeau-Rouquette et al., 1995). L'intervalle de confiance à 95 % (IC95 %) est calculé comme suit :

$$p \pm 1,98 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

où p est la proportion d'animaux détectés et n le nombre d'animaux testés.

Les données de valeurs prédictives négative et positive obtenues sont ensuite corrigées en tenant compte de la prévalence de l'infection dans l'ensemble de la population testée (4690 sangliers).

2. RÉSULTATS

2.1. Validation « laboratoire »

Toutes les souches de virus PPC sont détectées par RT-PCR en temps réel, alors que les autres pestivirus et d'autres virus porcins ne le sont pas. On constate une variabilité dans la détectabilité des souches en dilution de 1 à 1000 environ (Tableau 1).

Dans le cadre d'une infection expérimentale de six porcs EOPS par la souche PPC Eystrup, la rate, le rein, la valvule iléo-cæcale, et un ganglion mésentérique ont fait l'objet d'une recherche de génome viral par RT-nested PCR et par RT-PCR en temps réel ainsi que d'un essai d'isolement viral après l'abattage de trois porcs à 24 heures post infection (Hpi) et trois autres à 48Hpi. Le virus n'a pu être isolé qu'à partir des trois porcs abattus à 48Hpi, mais du génome viral PPC était détecté dès 24Hpi ainsi qu'à 48Hpi, par RT-nested PCR et RT-PCR en temps réel, à partir de six rates et des six ganglions mésentériques. La détectabilité était un peu plus faible sur les valvules iléo-cæcales dont une était négative à 24Hpi. Le rein s'est avéré ne pas être un organe de choix pour détecter l'infection car un seul des six prélèvements est sorti positif à 48Hpi. Cette expérience a confirmé la détectabilité très précoce de l'infection par la RT-PCR en temps réel.

En complément de ces premiers résultats, l'obtention de résultats conformes aux trois panels d'évaluation était un prérequis pour l'obtention de l'agrément initial. Ce sont ainsi 189 échantillons qui ont été évalués en parallèle par les trois méthodes, l'isolement viral, la RT-nested PCR et la RT-PCR en temps réel. Le niveau de détectabilité de la RT-PCR en temps réel était équivalent voir supérieur à celui de la RT-nested PCR en termes de détection précoce et aucun problème de spécificité n'a été identifié.

Le premier kit ainsi agréé (LSI Taqvet) a fait ensuite l'objet d'un essai inter-laboratoires par les deux laboratoires départementaux choisis pour mettre en œuvre les analyses dans le cadre de la surveillance des deux foyers de PPC chez les sangliers. Depuis un deuxième kit développé par Adiaçène a obtenu l'agrément et un nouvel essai interlaboratoires a été organisé au printemps 2005 avec cette fois huit laboratoires participants. Là encore les résultats conformes à ceux escomptés ont confirmé la reproductibilité de ces tests et la robustesse de ces deux kits.

2.2. Validation « terrain »

Sur les 4690 échantillons testés par RT-PCR en temps réel, 120 ont été analysés en parallèle par isolement viral et RT-PCR temps réel. Les résultats sont rapportés dans le tableau 3.

Sur les 4690 rates de sangliers analysées, 62 étaient positives en RT-PCR en temps réel, ce qui permet de définir une prévalence de l'infection dans la population de 1,3 %. Parmi ces 62 rates, 14 étaient positives en isolement viral.

En prenant comme technique de référence l'isolement viral, et en corrigeant les données en fonction de la prévalence de l'infection dans l'ensemble de la population testée, on obtient comme valeur prédictive positive 2,8 % (IC 95 % : 0-6) et une valeur prédictive négative de 100 %. Autrement dit à partir d'un échantillon positif en RT-PCR temps réel, on a seulement 2,7 % de chance d'isoler le virus sur culture cellulaire.

Pour tenter d'expliquer cette discordance de résultats, nous avons analysé les données de sérologie dont nous disposions. Parmi les 48 sangliers dont la rate était (PCR+/IV-), 38 avaient fait l'objet d'une recherche d'anticorps par ELISA

Tableau 3 - Performance de la RT-PCR temps réel par comparaison à l'isolement viral (gold standard) sur la base des 120 échantillons testés en double

		RT-PCR temps réel	
		négative	positive
Isolement viral	négatif	58	48
	positif	0	14

	%	Intervalle de confiance à 95%
Sensibilité	100	-
spécificité	54,7	46-64
Valeur prédictive positive	22,6	15-30
Valeur prédictive négative	100	-
Faux positifs	77,4	70-85
Faux négatifs	0	-

et 35 étaient positifs. La présence d'anticorps neutralisants du virus en complexant le virus empêche de fait son isolement sur culture cellulaire. Une recherche de génome de pestivirus et de virus PPC sur les trois échantillons (PCR+/IV-/ELISA-) a été menée en utilisant les RT-nested PCR décrites par McGoldrick et al. (1999). Ces trois échantillons ont ainsi été confirmés comme positifs.

L'analyse des valeurs de Ct (cycle threshold) obtenues pour les échantillons positifs par RT-PCR en temps réel indique que le virus était isolable pour tous les échantillons dont la valeur de Ct était inférieure à 25. En revanche, pour des Ct situés entre 26 et 32, l'isolement viral est plus aléatoire, dépendant en général de la présence ou non d'anticorps (Figure 1).

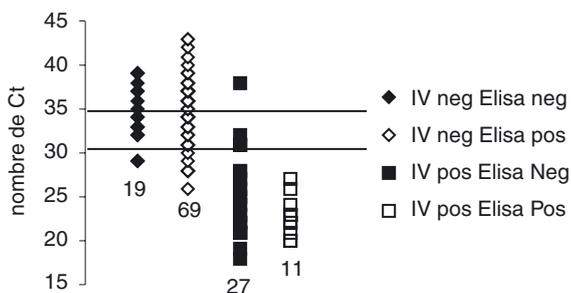


Figure 1 - Distribution des Ct (PCR temps réel) par rapport aux résultats d'isolement viral puis de sérologie (ELISA) pour 126 échantillons

3. DISCUSSION

Comme l'a préconisé l'OIE, nous avons défini les critères de validation de la méthode en fonction de l'objectif poursuivi ('fitness for purpose'), à savoir la mise en évidence du génome du virus PPC chez tout porc ou sanglier ayant été infecté. Nous avons procédé de cette démarche en demandant aux industriels de fabriquer des kits de qualité au moins équivalente à celles des tests publiés et couramment appliqués antérieurement, permettant de détecter du génome viral à partir de prélèvements sanguins ou d'organes de suidés infectés

par du virus de la PPC. Après un premier travail d'alignement de séquences, la comparaison avec des souches de différents génogroupes de virus PPC et d'autres pestivirus étaient un préalable nécessaire à la validation de ces nouveaux kits de détection. Il fallait aussi s'assurer que l'introduction du témoin interne permettant de vérifier l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques n'interférait pas avec l'amplification du fragment génomique d'intérêt. L'étude en dilution des souches virales montre qu'en diluant 10 000 fois les différentes souches titrant entre $10^{5,7}$ et $10^{7,1}$ DCP50/ml, on détecte encore du génome. Ce résultat laisse supposer une moins grande sensibilité de détection que l'isolement viral. Cependant tous les essais qui ont été menés sur des animaux infectés expérimentalement ont montré une détection plus précoce et plus tardive du génome. Il est fréquent de détecter du génome par RT-PCR dans des amygdales de porcs infectés jusqu'à au moins 42 jours post infection alors que l'isolement n'est plus possible dans les deux semaines post infection, spécifiquement chez des porcs vaccinés puis infectés (Utenthal et al., 2001 ; Utenthal et al., 2003).

L'utilisation d'un de ces kits de RT-PCR en temps réel pour l'épidémiologie de la PPC chez les sangliers sauvages dans le Nord Est de la France a permis de suivre en temps réel l'incidence de la maladie. La RT-PCR en temps réel permet de libérer en moins de 48 heures les carcasses de sanglier en les déclarant indemne ou non de virus PPC. L'infection de l'animal est confirmée par isolement viral sauf lorsque ces sangliers possèdent des anticorps neutralisants qui en complexant le virus empêche son isolement.

En absence d'anticorps, on peut supposer être soit en présence d'une infection très récente, le génome est détectable mais le virus n'est pas encore isolable en culture cellulaire, soit en présence d'un faux positif. La présence de génome a été confirmée par la technique de RT-nested PCR (Mc Goldrick et al, 1999) qui cible la même région conservée du génome PPC. Haegeman et al., (2005) ont cherché à amplifier trois autres régions du génome régulièrement distribué le long de l'ARN. Si ces trois régions sont toutes amplifiées par RT-PCR c'est que le génome est complet. Si au moins une de ces régions n'est pas amplifiée, cela signifierait que le génome viral est incomplet et expliquerait le défaut d'isolement.

On constate que les résultats obtenus par la méthode de RT-PCR en temps réel sont très fiables dans le sens où aucun faux négatif n'a été identifié (valeur prédictive négative à 100 %). La facilité de mise en œuvre du test et la rapidité d'obtention des résultats permettent de réaliser plus d'analyses pour un élevage et d'obtenir ainsi des résultats d'autant plus fiables. Avec une telle sensibilité de test, on peut penser dorénavant à de nouveaux scénarii de contrôle de la maladie en cas de foyer en élevage porcin. En effet comme l'ont déjà décrit Risatti et al., (2005), la sensibilité des méthodes de RT-PCR en temps réel excède largement celle de l'isolement viral et leur ont permis de déceler la présence de virus dans un élevage des Caraïbes là où l'isolement viral avait échoué.

On peut dès lors envisager d'utiliser cette méthode de détection dans le cadre de toutes suspicions de peste porcine sur

des lésions vues à l'abattoir comme lors de suspicion clinique en élevage. La possibilité de faire la recherche de génome à partir de sang prélevé sur EDTA permet d'obtenir un résultat très rapidement sans être obligé d'abattre des animaux à des fins d'analyses. Le manuel de diagnostic de la PPC annexé à la directive européenne en vigueur (2001/89/CE du 23 octobre 2001) oblige à confirmer le résultat obtenu par une autre méthode pour déclarer officiellement un foyer, la recherche de virus ou d'anticorps si les symptômes en élevage sont déjà anciens, doivent permettre de confirmer le premier résultat, mais dans l'attente des résultats de ces analyses plus lourdes à mettre en œuvre, des mesures conservatoires peuvent être appliquées à bon escient sur l'élevage. De même, la directive européenne 2001/89/EC prévoit la possibilité de recourir à une vaccination d'urgence en cas de foyers de PPC afin de limiter la diffusion du virus, mais le devenir de ces animaux est la destruction. En disposant d'un outil de diagnostic aussi performant que la RT-PCR temps réel, seuls les élevages reconnus infectés pourraient être éliminés, épargnant ainsi les élevages sous surveillance mais non infectés.

CONCLUSION

La disponibilité et les performances de ce nouveau type de technologie permettent d'envisager son utilisation dans différentes situations. Il serait très intéressant de l'utiliser dans les centres d'insémination artificielle, ceci afin de vérifier l'absence de virus dans les semences (van Rijn et al., 2004). A l'heure actuelle, différentes équipes travaillent à la mise au point de PCR multiplex, permettant de détecter simultanément différents virus pathogènes du porc, ces nouveaux tests demandent à être validés pour assurer l'absence de compétition entre pathogènes qui risquerait d'en masquer un ou plusieurs (Giammarioli et al., 2005).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient LSI et ADIAGENE pour leur collaboration, S. Martin (LVD 57), B. Paquant (LVD55), J.P. Buffereau (LDA22), S. Rossi (ONCFS) et N. Masse-Provins (DSV67) pour le transfert des résultats d'analyses faites sur sangliers et K. Michel pour la mise en forme de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Giammarioli M., Pellegrini C., Marchesi M., De Mia G., 2005. Development of a multiplex PCR for rapid detection of classical swine fever, african swine fever, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus. 6th ESVV pestivirus Symposium, 98.
- Haegeman A., Dewulf J., Ribbens S., Vrancken R., Koenen F., 2005. Characterisation of the decreased infectivity of CSF RT-NPCR positive, virus isolation (VI) negative samples. 6th ESVV pestivirus Symposium, 93.
- McGoldrick A., Bensaude E., Iyata G., Sharp G., Paton D.J., 1999. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *Journal of Virological Methods* 79, 85-95.
- Risatti G., Holinka L., Lu Z., Kutish G., Callahan J.D., Nelson W.M., Tio E.B., Borca M.V., 2005. Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 468-471.
- Rumeau-Rouquette C., Blondel B., Kaminski M., Bréart G., 1995. Evaluation de la valeur diagnostique d'une méthode de dépistage. In : *Epidémiologie, méthodes et pratiques*. Editeurs : Flammarion Médecine-Sciences, Chevilly-Larue chapitre 20, 294-306.
- Uttenthal A., Le Potier M.F., Romero L., DeMia G.M., FloegelNiesmann G., 2001. Classical swine fever (CSF) marker vaccine - Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Veterinary Microbiology* 83, 85-106.
- Uttenthal A., Storgaard T., Oleksiewicz M.B., deStricker K., 2003. Experimental infection with the Paderborn isolate of classical swine fever virus in 10-week-old pigs: determination of viral replication kinetics by quantitative RT-PCR, virus isolation and antigen ELISA. *Veterinary Microbiology* 92, 197-212.
- van Rijn P.A., Wellenberg G.J., HakzeVanderHoning R., Jacobs L., Moonen P.L.J.M., Feitsma H., 2004. Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative RealTime PCR(TM) technology. *Journal of Virological Methods* 120, 151-160.