

DETECTION DES PARVOVIRUS DES PALMIPÈDES PAR PCR EN TEMPS REEL

Jean-Luc Pingret¹, Catherine Zadjian², Stéphane Lemièrè³, Corine Boucraut-Baralon¹

¹SCANELIS, 23 chemin des Capelles 31076 Toulouse cedex3

²SASO, 30 chemin de la Menude – ZI En Jacca 31770 Colomiers

³MERIAL, 29 avenue Tony Garnier 69348 Lyon cedex 07

Détection des parvovirus des palmipèdes par PCR en temps réel – Utilisation de cette technique pour le suivi post-vaccinal du virus de Derzsy ainsi que comme indicateur en suivi d'élevage.

Les parvoviroses des palmipèdes sont dues à deux virus distincts, le parvovirus du canard de barbarie et le virus de la maladie de Derzsy. Le test « Parvo-Palmipèdes » développé par Scanelis comprend une amplification commune aux deux virus associée à deux sondes spécifiques émettant chacune une fluorescence caractéristique afin de typer la souche amplifiée. Cet outil diagnostique très sensible (seuil de détection à 95% < 5 copies équivalent génome par analyse) et spécifique (aucune détection des parvovirus canin, félin et de rat) a été utilisé pour évaluer la circulation des souches sauvages des deux parvovirus ainsi que pour suivre le virus de Derzsy d'origine vaccinale chez le canard de Barbarie et le canard mulard (étude en cours). Très récemment, Scanelis a complété ce test par un typage du virus de Derzsy afin de distinguer les souches de virus sauvage de la souche atténuée (Hoekstra) utilisée dans les vaccins Palmivax® et Parvokan® (Merial). Certains échantillons de cette étude ont pu être typés grâce à cette nouvelle technique.

La présence du virus vaccinal a pu être suivie dans différents prélèvements (rate, écouvillon cloacal, muscle, nerf). Suite à l'injection de rappel (J15), une augmentation importante de la quantité de génome viral vaccinal a été mise en évidence chez le canard de barbarie. Le virus est détectable pendant 2-3 semaines post-vaccination dans les différents types d'échantillons analysés et la rate est l'échantillon contenant généralement les plus fortes charges virales. De plus, au sein d'élevages sans signes cliniques évocateurs, nous avons détecté la souche sauvage du virus de Derzsy chez le mulard et le parvovirus du canard de barbarie chez le barbarie. La possibilité de détecter de très faibles charges de virus sauvage pourrait peut-être constituer un nouvel outil permettant d'anticiper l'éventuelle répllication du virus lors des prochaines mises en place, et ainsi être utilisé comme indicateur en suivi d'élevage.

Waterfowl parvoviruses (wild and vaccine strain) detection by Real-time-PCR – A new tool allowing viral survey in farming.

Two different viruses are the causative agents of waterfowl parvovirus diseases: Derzsy's disease virus, which affects goslings and Muscovy ducklings and the Muscovy duck parvovirus, which specifically infects muscovy duck. The real-time PCR assay designed by Scanelis amplifies a viral gene fragment with the same efficiency for both virus type, but two different fluorescent probes allow virus identification. This diagnostic method is very sensitive (detection limit is less than 5 copies of viral genome by analysis) and specific (no cross-reaction with any other parvovirus tested). We followed the vaccine strain (Hoekstra) of Derzsy's virus used in Palmivax® and Parvokan® (Merial) preparation in Muscovy and Mulard ducklings (study in progress). Another PCR assay was recently developed by Scanelis to identify the Derzsy strain detected (wild or vaccine).

The vaccine strain is detected during 2-3 weeks after the second injection in the different samples analysed (spleen, cloacal swabs, muscle, nerve) and most often, spleen is the sample with the higher virus load. Furthermore the results show the presence of the wild strain of Derzsy virus and the wild strain of Muscovy duck parvovirus in Mulard and Muscovy ducklings respectively but without any clinical signs. Such information obtained with this new tool could be a helpful indicator allowing viral survey in farming.

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 (Derzsy 1967 ; Schettler 1971 ; Jestin *et al.* 1991 ; Le Gall-Reculé et Jestin 1994). Afin de répondre à un besoin de la profession, Scanelis a développé un test original, fiable et surtout accessible en routine à tous les acteurs de la filière Palmipèdes. Ce test permet de détecter aussi bien le virus de la maladie de Derzsy que le parvovirus du canard de barbarie (Pingret *et al.* 2004), et il a été récemment associé à un typage différenciant les souches de virus sauvages de Derzsy de la souche vaccinale (Hoekstra) utilisée dans les vaccins Palmivax® et Parvokan® (Merial). Ce test utilisant la PCR en temps réel a été mis en oeuvre pour évaluer la prise vaccinale 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.

MATERIELS ET METHODES

Principe du test parvovirus : PCR en temps réel avec typage Derzsy/Parvovirus du canard de barbarie

Le virus de la maladie de Derzsy et le parvovirus du canard de barbarie sont deux virus génétiquement proches, ce qui nous a permis de concevoir un test de diagnostic par PCR en temps réel susceptible d'amplifier spécifiquement ces deux virus et dans le même temps de typer la souche (Derzsy ou Parvovirus du barbarie).

La PCR ou amplification par polymérisation en chaîne est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN. Lors de la PCR en temps réel on peut suivre l'avancement de cette amplification grâce à l'émission simultanée de fluorescence émise lors de l'hybridation d'une sonde spécifique sur les fragments amplifiés. Cette méthode permet de détecter de très faibles quantités de virus de façon très spécifique.

Dans le cas particulier du test Parvo-Palmipèdes nous avons choisi de concevoir une amplification commune aux deux virus en y associant deux sondes spécifiques émettant chacune une fluorescence caractéristique afin de typer la souche amplifiée.

Validation analytique du test parvovirus

Afin d'assurer la spécificité du test nous avons choisi une région du génome des virus correspondant à une signature génétique c'est à dire que cette séquence

d'ADN est totalement spécifique du pathogène recherché. La séquence choisie a été comparée avec des millions d'autres séquences afin de s'assurer de son unicité. Cette spécificité a été vérifiée expérimentalement en réalisant des analyses d'échantillons contenant des parvovirus canins (CPV1 et CPV2), félin (FPV) ou de rat (KRV) qui se sont toutes révélées négatives. De plus il n'y a aucun croisement de signal dans la détection du parvovirus du canard de barbarie et du virus de la maladie de Derzsy, il n'y a donc aucune ambiguïté lors du typage (résultats non présentés). Par ailleurs le test détecte spécifiquement les souches de références DPV 89139 et DPV 89384 (fournies par J-P. Picault AFSSA, Ploufragan, France) ainsi que la souche Hoekstra du virus de Derzsy (résultats non présentés).

La sensibilité analytique du test a été évaluée par des analyses de Probit. La région du génome d'intérêt a été clonée pour chacun de ces virus à partir d'échantillons de terrain pour lequel le typage a été réalisé par séquençage et les plasmides ont été dosés. Les performances du test ont été évaluées sur de faibles nombres de copies de plasmide. Le seuil de détection à 95% a été mesuré (analyse de Probit selon les recommandations de la pharmacopée européenne) comme étant inférieur à 5 copies d'équivalent génome viral par analyse pour les deux virus (Pingret *et al.* 2004).

Typage du virus de Derzsy : Sauvage/Hoekstra

Afin de pouvoir utiliser des techniques moléculaires pour évaluer la prise vaccinale de la valence Derzsy du vaccin Parvokan®, il est nécessaire de pouvoir différencier la souche vaccinale Hoekstra des souches sauvages de virus Derzsy éventuellement présentes dans les échantillons.

La VP2 est la protéine de capsid majoritaire des parvovirus et elle est également impliquée dans les processus immunitaires. Cette protéine est de ce fait un candidat idéal pour être le support de mutations caractéristiques de la souche vaccinale Hoekstra.

Afin d'identifier des différences génétiques caractéristiques de ces souches virales nous avons amplifié par PCR, séquencé et analysé la VP2 de 6 échantillons de virus de Derzsy. Quatre d'entre-eux proviennent de prélèvements soumis à Scanelis afin de réaliser un diagnostic lors d'un épisode clinique de Derzsy sur canard mulard. Ces prélèvements proviennent de 4 élevages différents du Sud-Ouest de la France. Les deux autres échantillons analysés correspondent à la souche vaccinale Hoekstra qui a été analysée deux fois afin d'assurer l'exactitude de la séquence et des éventuelles mutations détectées. Une des analyses a été réalisée à partir d'une dose de vaccin Palmivax®, l'autre à partir d'une dose de vaccin Parvokan®.

L'analyse des séquences obtenues pour les deux échantillons de la souche Hoekstra (Parvokan® et Palmivax®) montre 100% d'identité pour les 1764

nuléotides de la séquence de la VP2. La comparaison des séquences des souches sauvages et vaccinales a mis en évidence 14 polymorphismes au niveau nucléique conduisant à 5 polymorphismes au niveau de la séquence protéique. Scanelis a très récemment utilisé ces caractéristiques génétiques pour mettre au point un test de PCR en temps réel permettant de différencier les souches sauvages de Derzsy de la souche vaccinale Hoekstra.

Animaux

Canard de barbarie : Les analyses sont réalisées sur des canetons de barbarie ayant été vaccinés avec le Parvokan® selon le protocole classique J1 + J15-18. Quatre prélèvements différents (écouvillon cloacal, muscle, nerf, rate) sont analysés par PCR en temps réel afin de suivre la souche vaccinale Hoekstra. Suite à l'étude préliminaire, deux élevages conventionnels ont été inclus dans l'étude : l'un situé en Rhône Alpes (sur lequel nous avons également réalisé la pré-étude), l'autre en Vendée. La répartition des canetons en fonction de l'élevage d'origine est la suivante : J1 7/10 + 3/10 ; J11 7/10 + 3/10 ; J24 6/9 + 3/9 ; J32 3/6 + 3/6 ; J20 10/20 + 10/20.

Canard mulard : Huit élevages conventionnels ont été inclus dans l'étude et ils sont tous suivis par Catherine Zadjian (SASO). Trois protocoles vaccinaux avec Palmivax® ont été retenus : Vaccination J1, vaccination J15, vaccination J1+J15. Cette étude est actuellement en cours et les résultats obtenus sur un seul élevage ayant suivi le protocole J1+J15 sont présentés.

RESULTATS

Canard de barbarie

Les prélèvements collectés au cours de cette étude ont été réalisés dans deux élevages distincts. Une pré-étude a tout d'abord été réalisée sur un seul des 2 élevages, sur un petit nombre de canetons afin de s'assurer de la faisabilité du suivi du virus de Derzsy vaccinal. L'ensemble des résultats (étude + pré-étude) est présenté dans le tableau 1.

Nous avons détecté le virus de Derzsy dans 6 échantillons sur 40 à J1 et 7 échantillons sur 40 à J11 (Tableau 1). Le typage par PCR en temps réel des 6 échantillons J1 positifs en Derzsy (2 écouvillons cloacaux et 4 rates) et de 2 échantillons J11 (1 écouvillon cloacal et 1 rate) a montré qu'il s'agit de la souche Hoekstra dans 8 cas sur 8.

Suite à l'injection de rappel le nombre de prélèvements détectés positifs augmente fortement (33 échantillons positifs sur 36 à J24). Lors du typage viral réalisé sur 7 échantillons choisis au hasard, nous avons identifié la souche Hoekstra dans les 5 échantillons choisis à J24 (2 écouvillons cloacaux et 3 rates) et les 2 choisis à J32 (1 muscle et 1 rate). Le

virus de Derzsy est détectable dans les 4 types d'échantillons analysés (rate, nerf, muscle, écouvillon cloacal) et cela persiste au moins 2 semaines chez certains sujets.

L'analyse d'écouvillons cloacaux réalisés plusieurs semaines après la dernière injection vaccinale (J70) n'a permis de mettre en évidence aucun des 2 virus (Derzsy, parvovirus du canard de barbarie). L'excrétion et probablement la réplication du virus vaccinal semblent donc être terminées à cette date.

Les charges en virus de Derzsy (en nombre de copies de génome viral / prise d'essai) ont été mesurées pour tous les échantillons positifs. Seuls 11 d'entre eux présentent une charge supérieure au seuil de quantification du test développé (200 copies de génome viral / PCR). Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Dans cette étude ce sont les rates qui contiennent généralement les plus grandes quantités de génome viral (9 prélèvements quantifiables sur 11 sont des rates). Il est également intéressant de noter que 8 des 11 prélèvements quantifiables ont été réalisés à J24 soit 9 jours après la seconde injection. Les charges virales détectées dans les rates sont importantes (2.10^4 à 10^6 génomes viraux par prise d'essai) et sont même comparables aux charges généralement retrouvées dans les rates lors d'un épisode clinique de Derzsy (Pingret *et al.* 2004).

L'ensemble des typages de virus de Derzsy qui ont été réalisés nous a permis de constater que seule la souche vaccinale Hoekstra est détectée, aucune circulation de souche sauvage de virus Derzsy n'est mise en évidence. Par contre on observe une circulation de parvovirus du canard de barbarie (DPV) dans les 3 premières semaines suivant la mise en place. Cette faible charge virale en DPV (inférieure au seuil de quantification) est détectable sur certains sujets uniquement, dans la rate et l'écouvillon cloacal. Cette circulation virale n'est plus détectable à J32 ni à 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 parvo de Barbarie*	Positif Derzsy*	Charge virus Derzsy **- (nombre d'échantillons quantifiés)
1 jour	Ec. cloacal	4/10	2/10	< seuil de quantification
	Nerf	0/10	0/10	-
	Muscle	0/10	0/10	-
	Rate	4/10	4/10	< seuil de quantification
11 jours	Ec. cloacal	1/10	1/10	< seuil de quantification
	Nerf	0/10	2/10	< seuil de quantification
	Muscle	0/10	2/10	< seuil de quantification
	Rate	0/10	2/10	< seuil de quantification
24 jours	Ec. cloacal	2/9	6/9	< seuil de quantification
	Nerf	0/9	9/9	< seuil de quantification
	Muscle	0/9	9/9	< seuil de quantification
	Rate	0/9	9/9	21100 – 1033900 (8)
32 jours	Ec. cloacal	0/6	2/6	< seuil de quantification
	Nerf	0/6	4/6	330600 (1)
	Muscle	0/6	4/6	760300 (1)
	Rate	0/6	4/6	34200 (1)
70 jours	Ec. cloacal	0/20	0/20	-

* Nombre de positifs / nombre de sujets testés.

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

Canard mulard

Une étude similaire à celle développée sur le canard de barbarie a été engagée sur le canard mulard afin de suivre la souche vaccinale du virus de Derzsy. De plus, des résultats préliminaires (non présentés) semblent indiquer que la présence du virus sauvage chez des animaux ne présentant pas de signes cliniques caractéristiques, pourrait peut être expliquer l'apparition d'épisode aigu sur certains sites de manière récurrente. Les premiers résultats obtenus sur un seul élevage vacciné au Palmivax® selon un

protocole J1+J15 sont présentés dans le tableau 2. Le génome du virus de Derzsy vaccinal est détecté quelques jours après l'injection de rappel. De plus une circulation du virus sauvage a été mise en évidence dans certains écouvillons cloacaux (3/6) à 7 jours. Les quantités de virus contenues dans ces échantillons positifs étaient toutes trop faibles pour pouvoir être quantifiées. On peut également remarquer que le parvovirus du canard de barbarie n'est détecté sur aucun prélèvement de canard mulard.

Tableau 2 – Récapitulatif des résultats PCR obtenus chez 1 lot de canards mulards (élevage conventionnel).

Protocole vaccinal	Age de l'animal	Nature du prélèvement	Positif Derzsy* (typage)	Positif parvo de Barbarie*
J1 + J15 Palmivax® (Merial) (Hoekstra – souche atténuée de Derzsy)	1 jour	Ec. cloacal	0/5	0/5
		Rate	0/1	0/1
	7 jours	Ec. cloacal	3/6 (sauvage)	0/6
		Rate	1/1 (Hoekstra)	0/1
	21 jours	Ec. cloacal	5/5 (Hoekstra)	0/5

* Nombre de positifs / nombre de sujets testés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Grâce au test de PCR en temps réel la souche Hoekstra du virus de Derzsy a pu être suivie sur le canard de barbarie vacciné au Parvokan®. Cette souche vaccinale est retrouvée en grande quantité

dans la rate dans les 5 à 15 jours suivant la seconde injection (J15) indiquant une très probable multiplication de la souche Hoekstra de Derzsy chez ces animaux. Les premiers résultats semblent indiquer un processus similaire chez le canard mulard. Cependant une étude complémentaire (sur le barbarie et le mulard) incluant un suivi sérologique des

animaux serait souhaitable pour étudier l'impact de cette probable réplication virale sur la réponse immunitaire.

Au cours de cette étude nous avons également détecté de faibles de quantité de génomes viraux des souches sauvages sur des animaux sans signes cliniques évocateurs au sein d'élevages conventionnels : le parvovirus du canard de barbarie sur des canards de barbarie et la souche sauvage de Derzsy sur des canards mulards.

Les performances de cette nouvelle technique d'analyse permettent d'envisager son utilisation pour suivre la prise vaccinale de la valence Derzsy et éventuellement optimiser les protocoles vaccinaux.

La possibilité de détecter de très faibles charges de virus sauvage (Derzsy et Parvovirus du canard de barbarie) constitue peut-être un moyen permettant de d'anticiper l'éventuelle réplication massive du virus lors des prochaines mises en place. Cette information précoce permettrait une vigilance accrue et la mise en place de mesures prophylactiques adaptées (vide sanitaire, désinfection, vaccination...).

BIBLIOGRAPHIE

Derzsy, D. 1967. A viral disease of goslings. I. Epidemiological, clinical, pathological and aetiological studies. *Acta Vet Acad Sci Hung* **17**:443-448.

Jestin, V., Le Bras, M., Cherbonnel, M., Le Gall, G. and G. Bennejean, 1991. Isolement de virus de

Derzsy très pathogènes chez le canard de Barbarie. *Recueil de Medecine Vétérinaire* **167**, 849-857.

Le Gall-Reculé, G. and V. Jestin. 1994. Biochemical and genomic characterization of muscovy duck parvovirus. *Arch Virol* **139**:121-131.

Pingret J.-L., Zadjian C. et Boucraut-Baralon C. 2004. Détection des parvovirus des palmipèdes par PCR en temps réel – Mise en place d'un diagnostic sur la maladie de Derzsy. 9^{ème} Journée Technique de la Sepalm.

Schettler, C. 1971 Apr-Jun. Isolation of a highly pathogenic virus from geese with hepatitis. *Avian Dis* **15**:323-325.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier particulièrement Monsieur Jean-Paul Picault de l'Unité Virologie Immunologie Parasitologie Aviaires et Cunicoles de l'AFSSA à Ploufragan (22, France) pour nous avoir gracieusement fourni les souches de référence du parvovirus du canard de barbarie (DPV 89384 et DPV 89139).

Nous tenons également à associer mesdemoiselles Laetitia Baqué et Mélanie Le Roux pour leur précieuse aide technique au cours de cette étude.