

L'ecthyma contagieux en France : Diagnostic et caractérisation préliminaire de souches circulantes

The orf virus in France: Diagnosis and preliminary characterization of circulating strains

DUQUESNE V. (1), LARA G. (1), RUSSO P. (1) THIERY R. (1), DUBOIS E. (1)

(1) Anses Laboratoire de Sophia-Antipolis, Unité Pathologie des Ruminants, 105 route des Chappes, BP111, 06902 Sophia Antipolis cedex, France

INTRODUCTION

L'ecthyma contagieux est une maladie infectieuse et contagieuse, due à un parapoxvirus, qui infecte essentiellement les ruminants. Elle se transmet principalement par contact direct, bien que le virus soit résistant dans le milieu extérieur. Cette maladie est mondialement répandue chez les ruminants domestiques et ceux de la faune sauvage. Le diagnostic vétérinaire peut être réalisé par microscopie électronique à partir de prélèvements de lésions le plus souvent cutanées. La nécessité d'une quantité importante de particules virales, d'un appareillage spécialisé et d'un personnel expérimenté constituent les limites de cette méthode.

Les méthodes de diagnostic moléculaire rendent plus aisée l'analyse au laboratoire. Plusieurs méthodes décrites ciblent une région conservée d'un gène codant une protéine majeure d'enveloppe (B2L). Ce gène est également utilisé pour la comparaison des souches.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 ECHANTILLONS ANALYSES

Trente huit échantillons recueillis entre 2006 et 2008 ont été analysés en microscopie électronique (ME) et en PCR.

Seize échantillons recueillis en 2009 ont été analysés uniquement en PCR.

1.2 EXTRACTION ET AMPLIFICATION DE L'ADN VIRAL

Tous les échantillons à partir de 2009 ont été broyés en PBS en présence de billes de tungstène. Après centrifugation, 100µl de surnageant sont utilisés pour l'extraction de l'ADN avec le DNesay Tissue Kit (Qiagen).

Deux PCRs conventionnelles ont été mise en place : (a) amplification d'un fragment de 594pb (157-750 nt) utilisé en routine, (b) amplification du gène entier (1196 pb) pour le séquençage. L'alignement des séquences obtenues est réalisé sur 1084 pb par le logiciel CLUSTAL X.

2. RESULTATS

2.1. COMPARAISON DES RESULTATS ME / PCRS

Les 54 échantillons ont été analysés en PCRS conventionnelle et temps réel. La comparaison des deux méthodes (tableau 1) montre que la PCR en temps réel détecte environ 26% d'échantillons en plus que la PCR conventionnelle.

Tableau 1

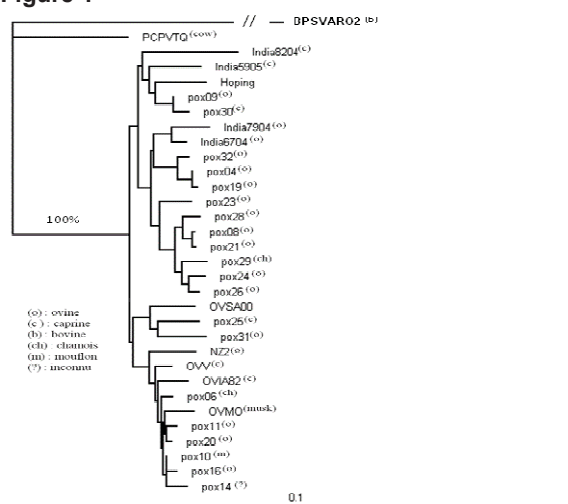
	PCR conventionnelle	PCR en temps réel
Echantillons (+)	33 (61%)	47 (87%)
Echantillons (-)	21 (39%)	7 (13%)

Les résultats de PCR conventionnelle et temps réel montre respectivement que 26 et 34 échantillons (sur les 38 analysés) sont positifs. La PCR en temps réel apparait donc plus sensible que la PCR conventionnelle et que la ME (tableau 2).

2.2. ANALYSE PHYLOGENETIQUE

Les séquences ont été comparées avec celles disponibles dans les bases de données. L'analyse montre que les souches rencontrées en France se répartissent dans les deux génogroupes connus et représentés par les souches NZ2 et Hoping. Plusieurs échantillons ont montré une séquence strictement identique. Aucune relation n'a pu être faite entre l'espèce, l'origine géographique et l'année d'échantillonnage.

Figure 1



3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Le diagnostic de routine de l'ecthyma contagieux en France est principalement basé sur les signes cliniques et l'examen des lésions. La mise en évidence du virus pour confirmation était jusqu'à lors réalisé par ME. Cette étude montre l'intérêt du diagnostic par PCR et notamment par PCR en temps réel. Elle offre une meilleure sensibilité vis-à-vis de la ME et de la PCR conventionnelle. La spécificité a pu être évaluée par séquençage des produits obtenus et une étude sur des prélèvements d'animaux indemnes est en cours.

L'analyse phylogénétique des virus rencontrés en France montre qu'ils sont proches des virus déjà décrits. Ces premières données ouvrent des perspectives méthodologiques pour le diagnostic et l'étude des parapoxvirus en France. La population n'étant plus vaccinée vis à vis du virus de la vaccine, cette zoonose mineure pourrait augmenter le nombre de cas d'infection chez les jeunes éleveurs.

Tableau 2

	Microscopie Electronique	PCR conventionnelle	PCR en temps réel
Echantillons (+) de 2006 à 2008	28	26	34
Echantillons (-) de 2006 à 2008	10	12	4
Sensibilité de la méthode	-	0,82	0,96

Inoshima et al., 1999. J.Virol.Methods 84,201-208
 Gallina et al., 2006. J.Virol.Methods 134,140-145
 Hosamami et al., 2006. Vet.Microbiol. 116, 317-324
 Chan et al., 2007. Virus Genes 35, 705-712