



HAL
open science

Validation d'une méthode de diagnostic moléculaire du Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela (VEEV)

Marine Dumarest, Camille Victoire Migné, Naomie Ramage, Teheipuaura Helle, Nolwenn M. Dheilly, Cécile Beck, Stéphan Zientara, Gaëlle Gonzalez

► To cite this version:

Marine Dumarest, Camille Victoire Migné, Naomie Ramage, Teheipuaura Helle, Nolwenn M. Dheilly, et al.. Validation d'une méthode de diagnostic moléculaire du Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela (VEEV). Journée Francophone de Virologie, Apr 2023, Paris, France. hal-04311615

HAL Id: hal-04311615

<https://hal.science/hal-04311615>

Submitted on 28 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Validation d'une méthode de diagnostic moléculaire du Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela (VEEV)

Marine Dumarest¹, Camille V Migné¹, Naomie Ramage¹, Teheipuaura Helle¹, Nolwenn M Dheilly¹, Cécile Beck¹, Stephan Zientara¹, Gaëlle Gonzalez¹

¹Anses, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR Virologie, Laboratoire de Santé Animale, 94700 Maisons-Alfort.

CONTEXTE

VEEV, *Alphavirus* appartenant à la famille *Togaviridae*, est transmis par des moustiques des genres *Aedes*, *Culex* et *Psorophora*.

Le virus est responsable d'encéphalites chez le cheval, avec une mortalité de 40 à 90%, mais également chez l'Homme. Les équidés servent d'hôtes amplificateurs pour les souches épizootiques.

Désormais classé dans les catégories D et E par la nouvelle loi de santé animale, VEEV est soumis à une obligation de déclaration et de surveillance en Europe.

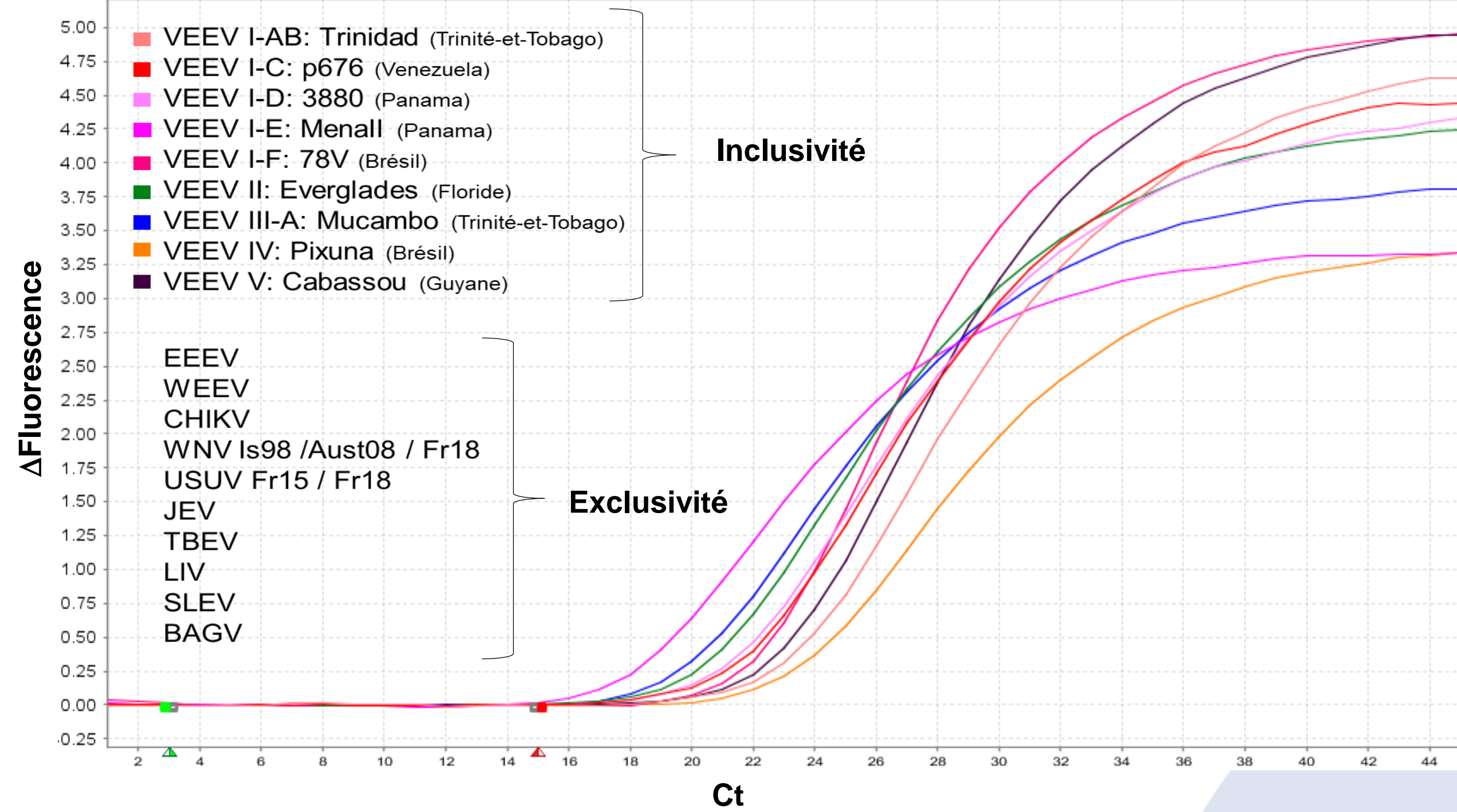


OBJECTIF

➤ Développer une technique de biologie moléculaire: **RT-PCRq spécifique et sensible**, capable de détecter les **sous-types circulant de VEEV**

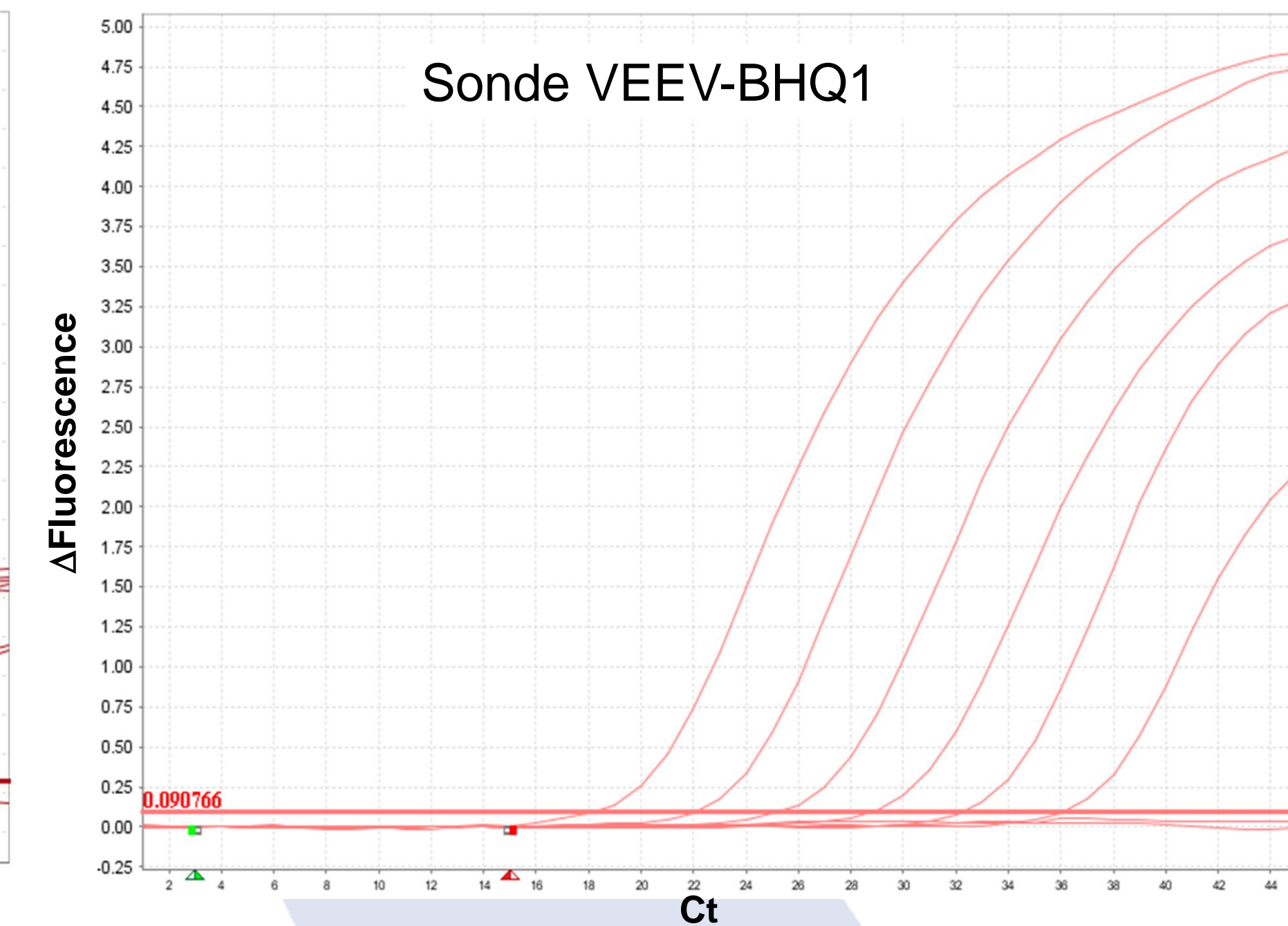
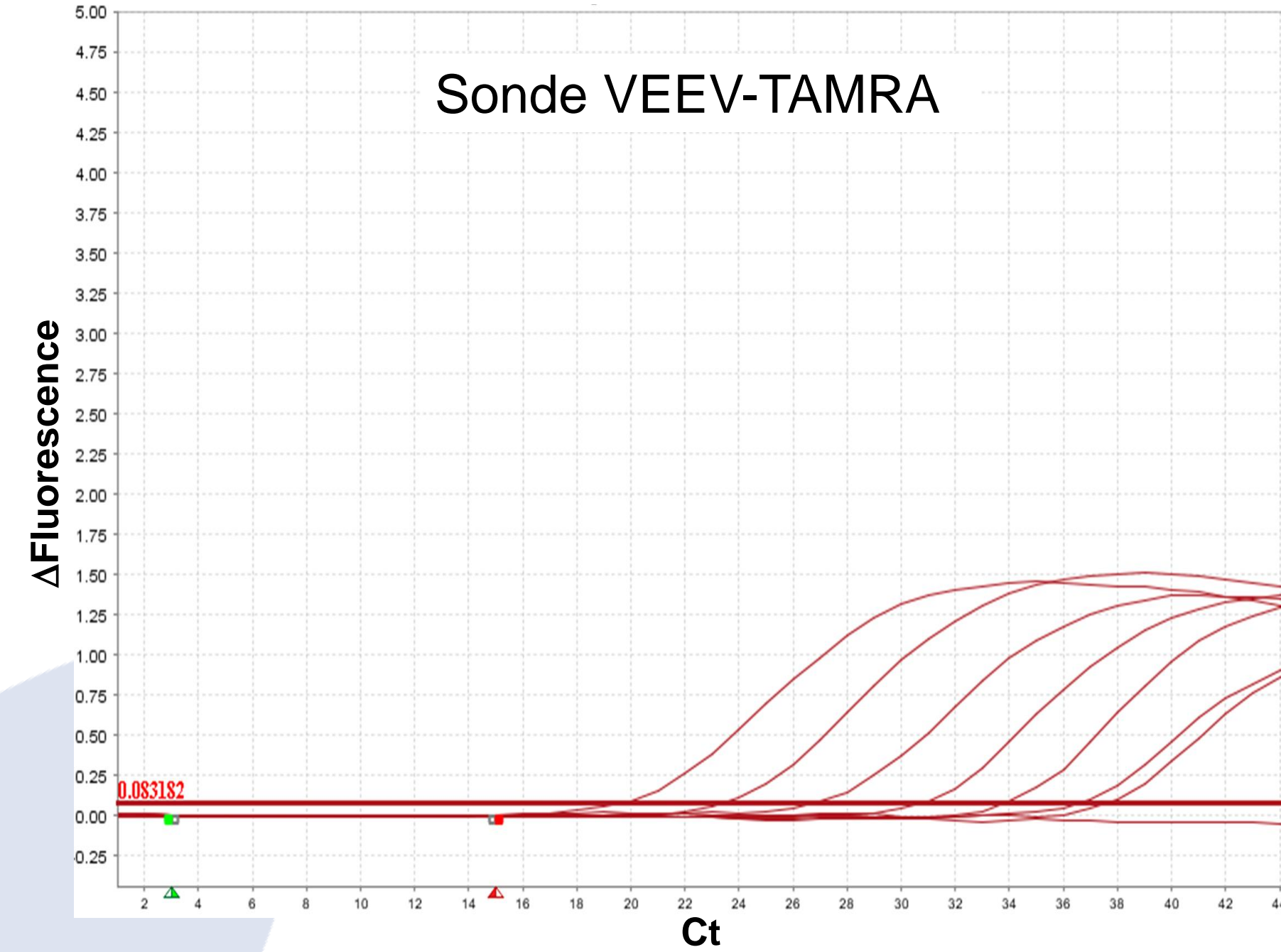
RESULTATS

1. Spécificité de la RT-qPCR: tests d'inclusivité et exclusivité



✓ **Spécificité validée:** détection uniquement des 9 sous-types de VEEV.

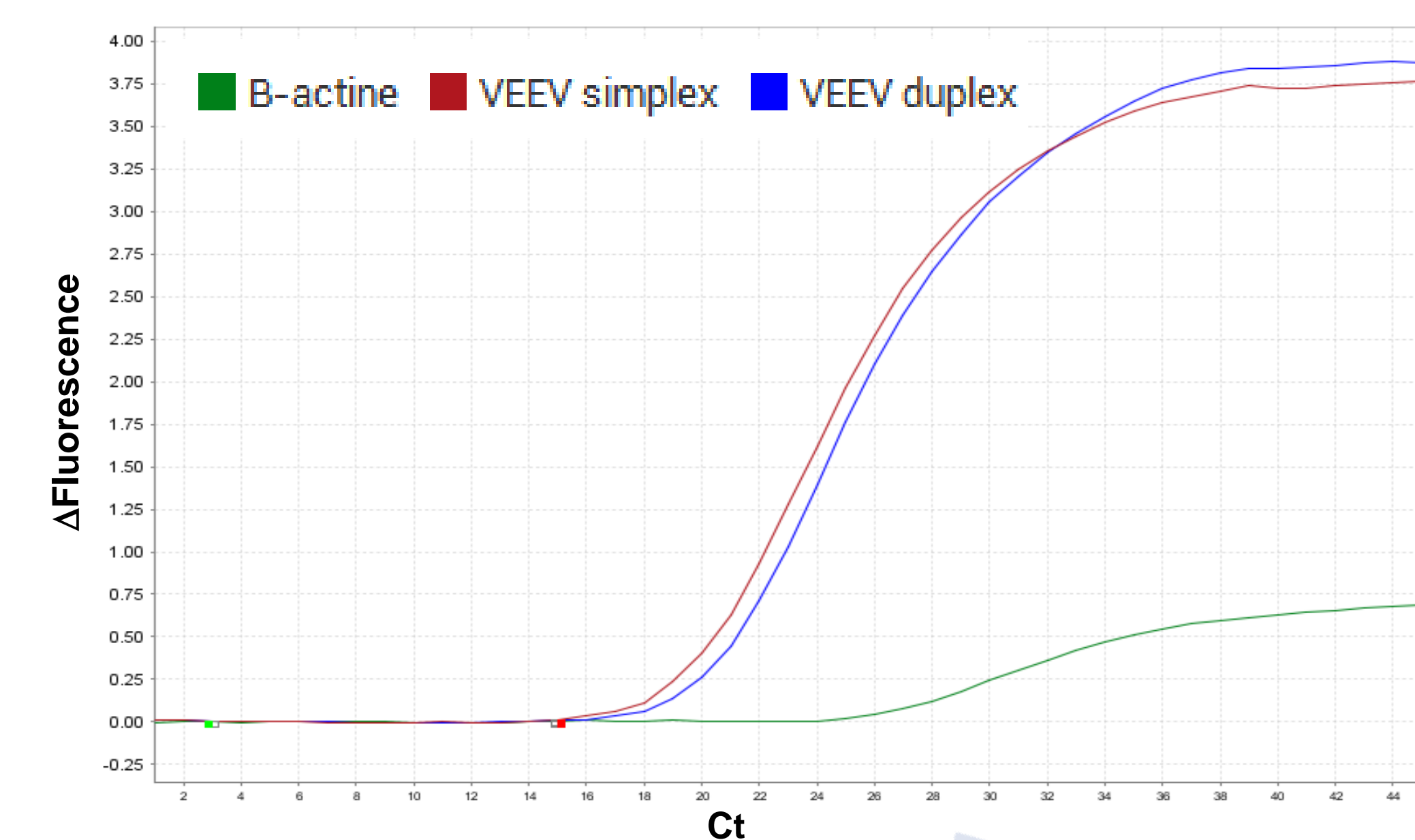
2. Optimisation de la sensibilité : impact du quencher utilisé sur la sonde



✓ **Sensibilité optimisée:** détection précoce et profil des courbes améliorée avec la sonde VEEV-BHQ1

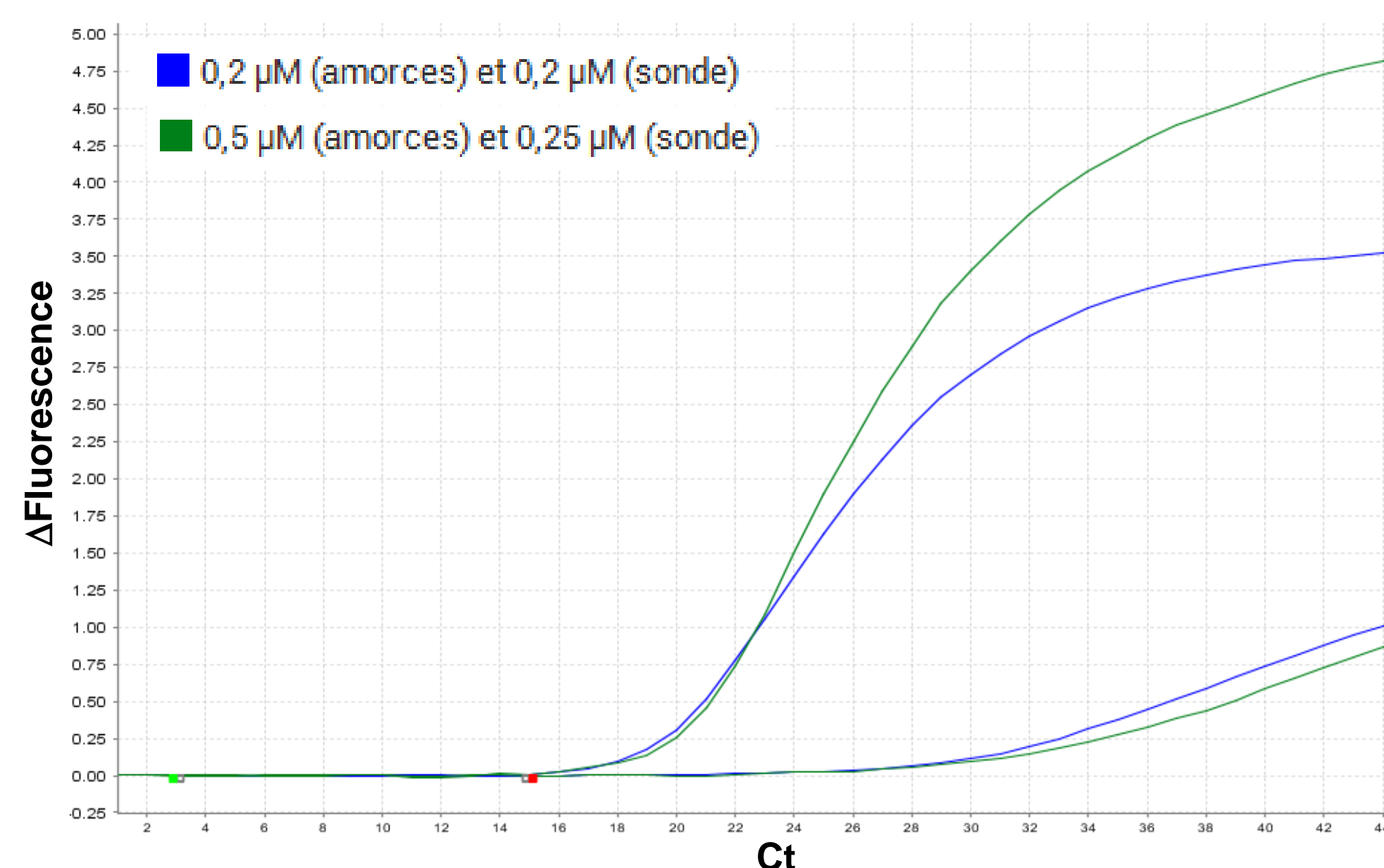
3. Optimisation de la sensibilité de la RT-qPCR duplex β-Actine/VEEV

A. Ajout du gène β-Actine comme contrôle interne



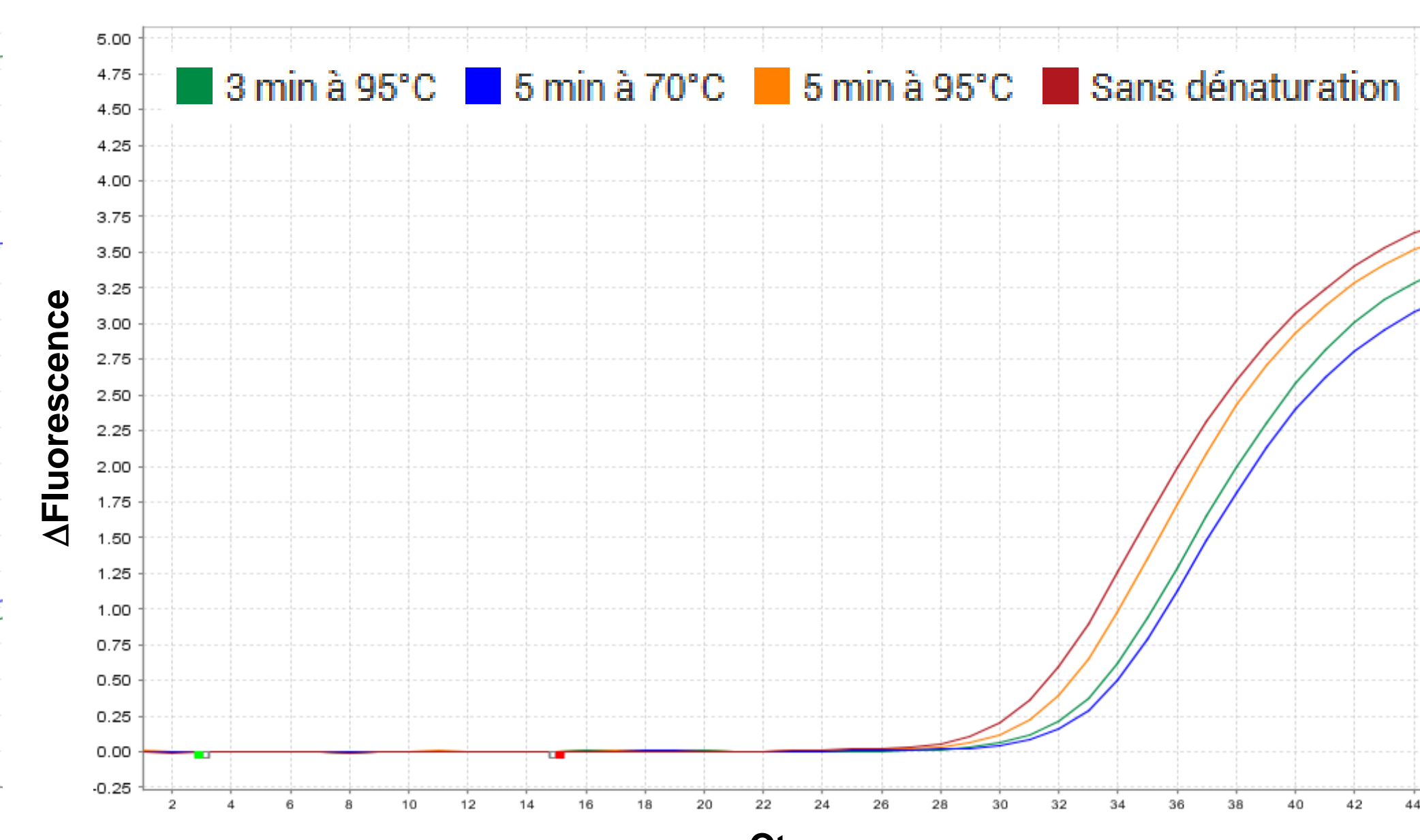
✓ **Sensibilité de la RT-qPCR duplex β-Actine/VEEV identique** à la RT-qPCR VEEV.

B. Variation des concentrations d'amorces et sonde β-actine et dénaturation préalable des échantillons à la chaleur



✓ **Sensibilité de la RT-qPCR duplex β-Actine/VEEV identique** quelques soient la concentration d'amorces et sonde utilisées

✓ Pas d'amélioration de la sensibilité de la technique suite à la dénaturation des échantillons



CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

➤ **Spécificité optimale** de la RT-qPCR VEEV/β-Actine : détection uniquement de souches circulantes VEEV

➤ Limite de méthode évaluée à **50 copies/ μL d'ARN**

➤ **Mise à disposition des 26 états membres de l'Union Européenne d'une méthode de détection moléculaire sensible et spécifique du VEEV en cas d'importation d'animaux en Europe, en provenance de l'Amérique.**

➤ Tests de répétabilité, reproductibilité et robustesse à réaliser sur échantillons « terrains » en vue d'une accréditation COFRAC

REFERENCES

Vina-Rodriguez A, et al. *A Quantitative Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Venezuelan equine encephalitis virus Utilizing a Universal Alphavirus Control RNA*. Biomed Res Int. 2016;2016:8543204.

Toussaint JF, et al. *Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments*. J Virol Methods. 2007;140(1-2):115-23.

NF U 47-600-2. *Méthodes d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne) Partie 2: Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale*. AFNOR. 7 Février 2015.