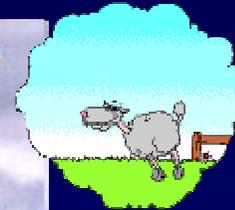
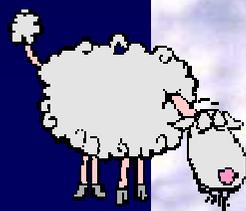
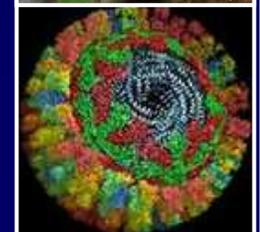
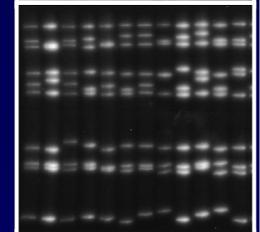
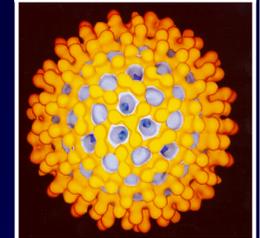
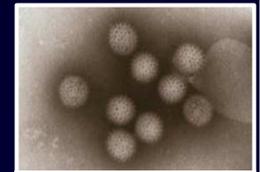


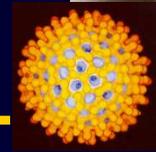
# Développement d'outils d'identification et de typage des orbivirus (action A1)

Stéphan ZIENTARA, Corinne SAILLEAU, Emmanuel BREARD, Cyril VIAROUGE, Kamilla GORNA, Anthony RELMY, Alexandra DESPRAT  
**UMR Afssa/INRA/ENVA**  
**Maisons-Alfort, France**



AFSSA, 18 mars 2010

# Plan



- Outils moléculaires pour identification et typage des virus de la FCO - réseau de LVD

## **DIAGNOSTIC : DEVELOPPEMENT ET AMELIORATION DES METHODES**

Action A1 : Détermination des sérotypes de virus FCO par typage moléculaire

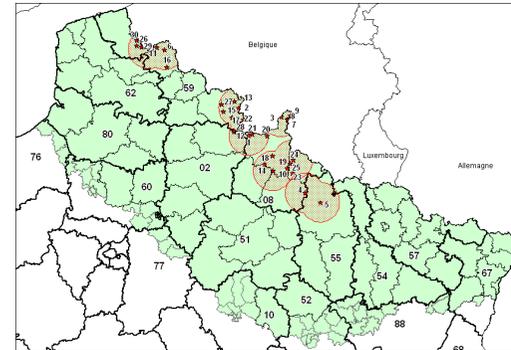
- Enquête sur la présence du virus Toggenburg
- Nouveaux isolats du virus FCO en Martinique
- Maladie épizootique hémorragique (EHD) à la Réunion

# Réseau de laboratoires pour rt-RT-PCR de groupe



2006 : 7 cas  
2007 : > 14 000 cas  
2008 : > 38000 cas

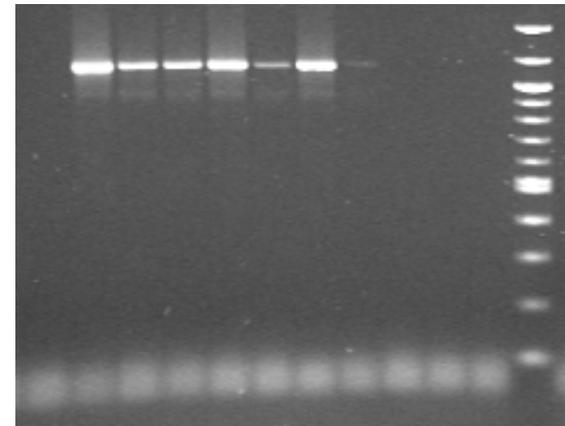
LNR Afssa : 3 personnes

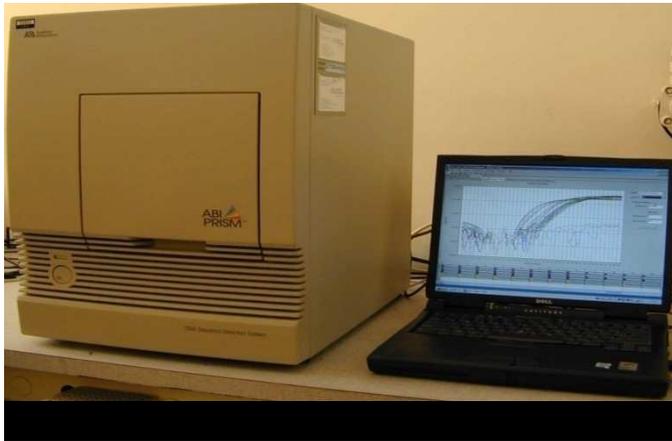


Diagnostic par RT-PCR conventionnelle



Nécessité d'utiliser de nouvelles méthodes  
Nécessité de décentralisation





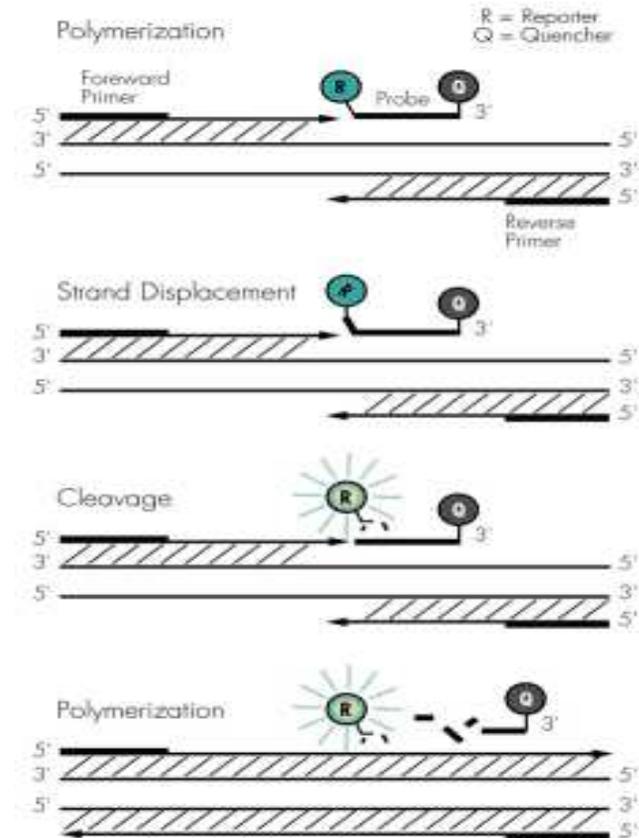
CIBLES : VP1 and NS1

Validation de 2 rt-RT-PCR  
avec Kris de Clercq and coll. (CERVA-CODA)

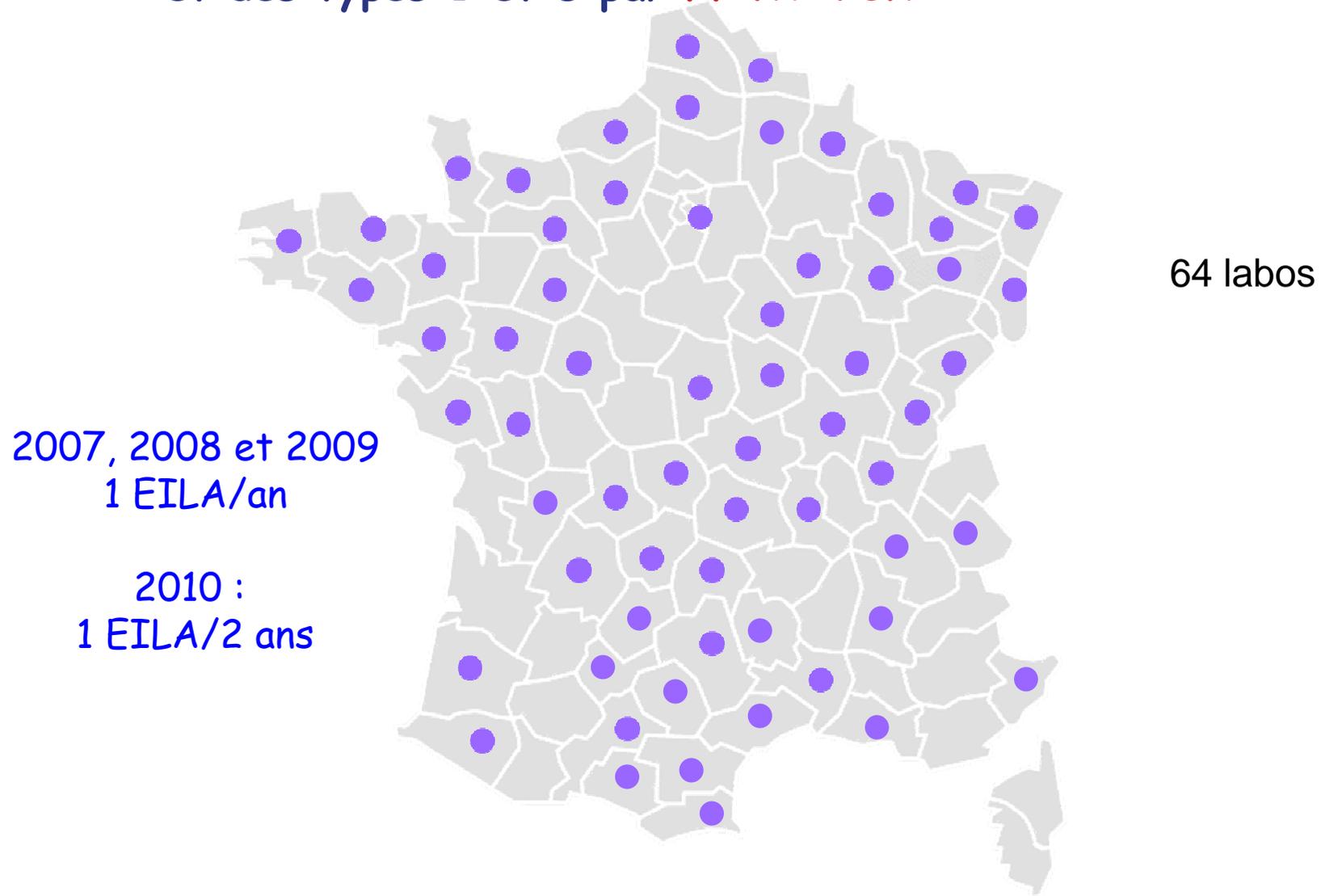


TOUSSAINT J.F., SAILLEAU C., BREARD E., ZIENTARA S., DE CLERCQ K. 2007. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. **J. Virol. Methods**,

21 140(1-2), 115-123.



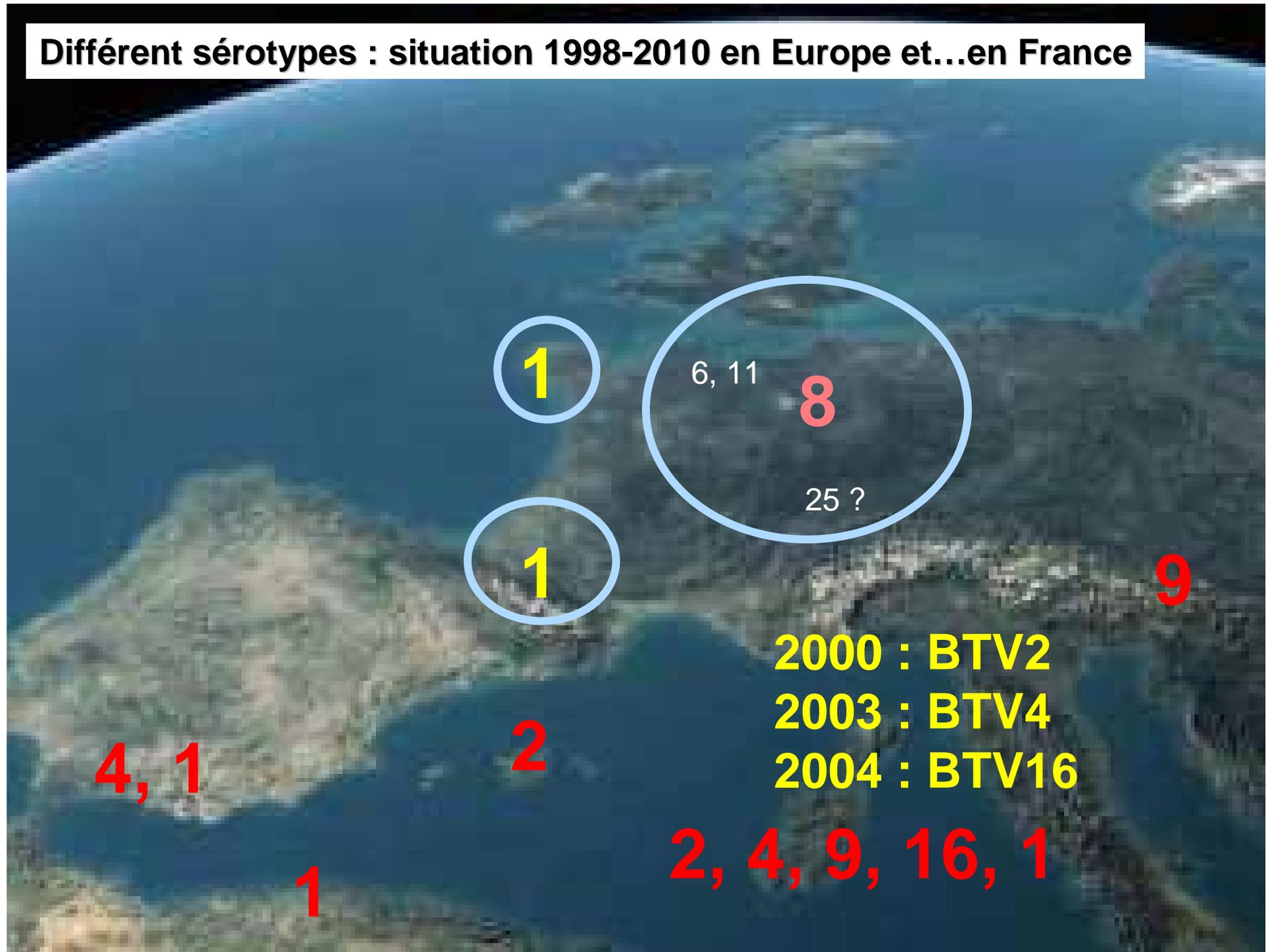
# Réseau français de LVD pour diagnostic de groupe et des types 1 et 8 par **rt-RT-PCR**



# Typage virus de la FCO



# Différent sérotypes : situation 1998-2010 en Europe et...en France



2008-2009

**DIAGNOSTIC : DEVELOPPEMENT ET AMELIORATION DES METHODES**  
Action A1 : Détermination des sérotypes de virus FCO par typage moléculaire

Développement de rt-RT-PCR spécifiques de type (S2)

Collaboration avec des industriels (AES-ADIAGENE et LSI) pour développement de kits « prêts à l'emploi » et automatisables

Validation par l'Afssa (LNR) et l'IAH Pirbright (LCR)

	FCO	
DUPLEX	TRIPLEX	EHDV DUPLEX
BTV + IPC	<i>BTV + BTV1 + IPC</i>	<i>EHDV + IPC</i>
BTV1 + IPC	<i>BTV + BTV8 + IPC</i>	
<i>BTV2 + IPC</i>		
<i>BTV4 + IPC</i>		
BTV6 + IPC		
BTV8 + IPC		
<i>BTV9 + IPC</i>		
<i>BTV11 + IPC</i>		
<i>BTV16 + IPC</i>		

## EILA 2009

### Participants

↳ 64 labos

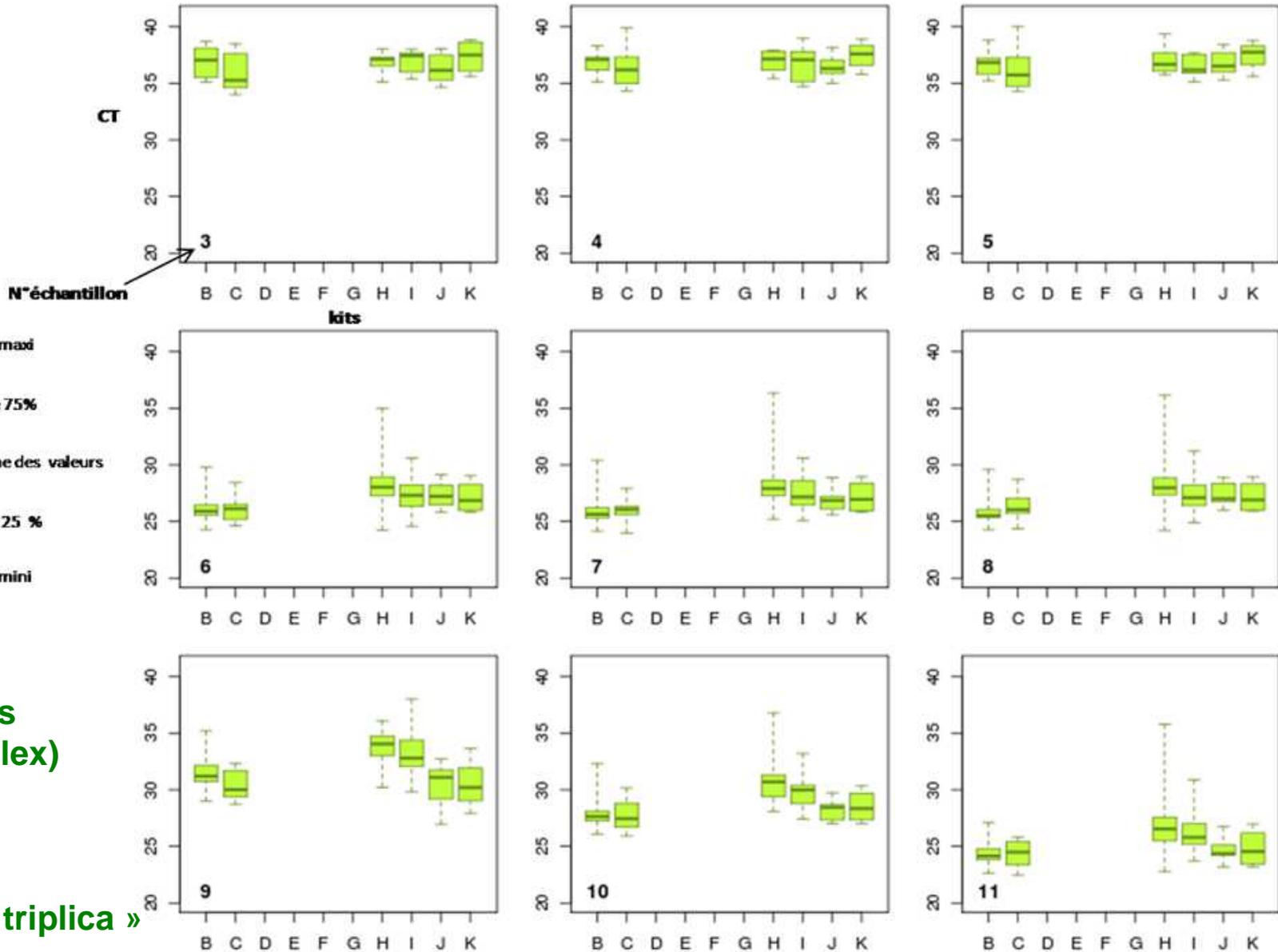
### Echantillons

↳ sang total (EDTA): panel de 11 échantillons

Echantillon	Nature	Résultat attendu
1	négatif	Négatif
2	négatif	Négatif
3=4=5	Positif BT1 faible	Positif BT1*
6=7=8	positif BT8	Positif BT8
9	Positif BT6	Positif non 1 non 8
10	Positif BT11	Positif non 1/non 8
11	Positif BT8/1	Positif BT8/BT1*

# Groupe-rtRT-PCR (analyses : Benoit Durand)

A

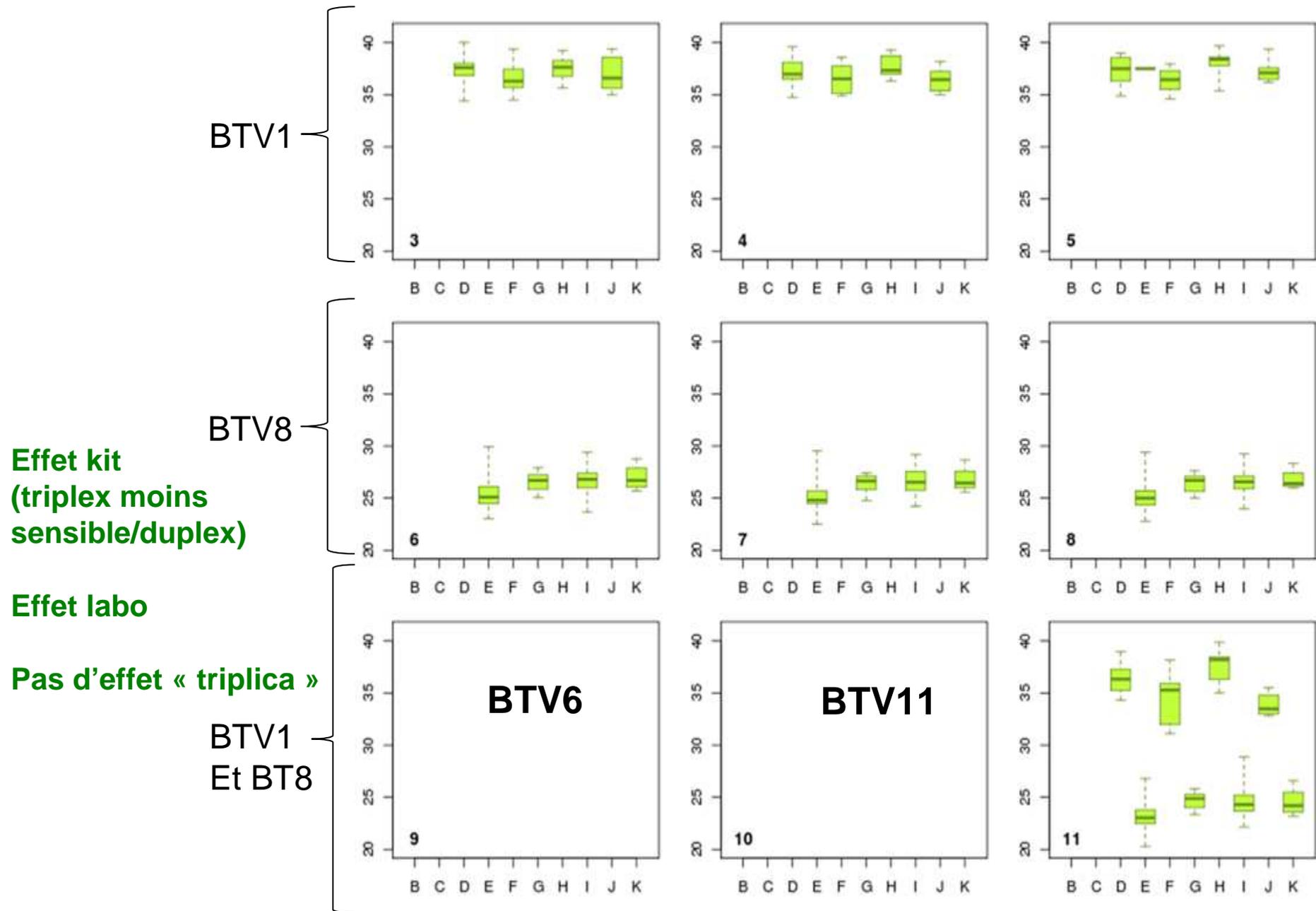


Effet kit  
(triplex moins  
sensible/duplex)

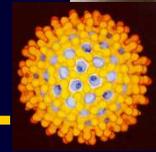
Effet labo

Pas d'effet « triplica »

# Type rt-RT-PCR

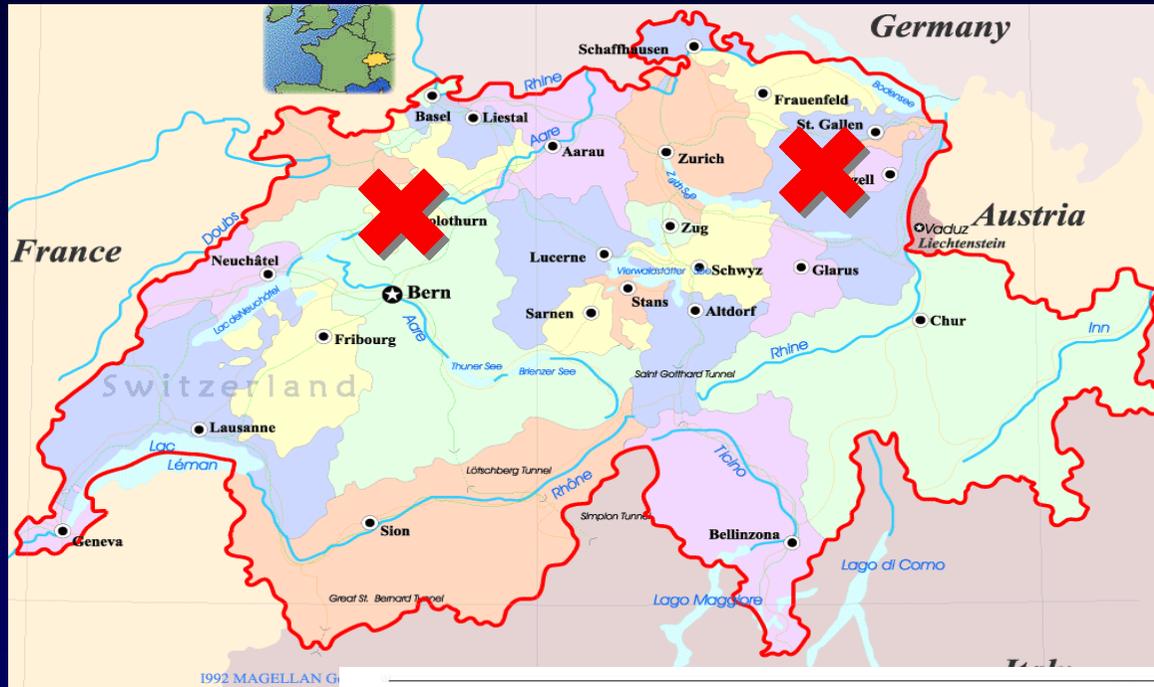
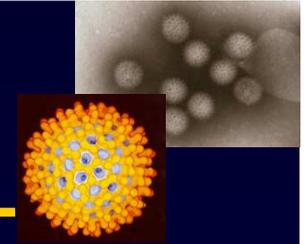


# Plan



- Bilan sur la situation épidémiologique de la FCO en France de 2006-2010
- Outils moléculaires pour identification et typage des virus de la FCO - réseau de LVD
- **Enquête sur la présence du virus Toggenburg**
- Nouveaux isolats du virus FCO en Martinique
- Maladie épizootique hémorragique (EHD) à la Réunion

# Virus Toggenburg (TOV)



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

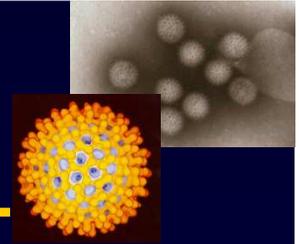


Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: Initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep

Valérie Chagnat<sup>a</sup>, Gabriella Worwa<sup>a</sup>, Nicole Scherrer<sup>a</sup>, Monika Hilbe<sup>b</sup>, Felix Ehrensperger<sup>b</sup>, Carrie Batten<sup>c</sup>, Mandy Cortyen<sup>c</sup>, Martin Hofmann<sup>a</sup>, Barbara Thuer<sup>a,\*</sup>



# Présence de TOV en France ?



Échantillons de sang (EDTA)



extraction ARN



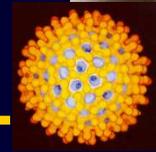
RT-PCR amplification du segment S2

Dr. Martin Hofmann  
Institute of Virology and Immunoprophylaxis (IVI)



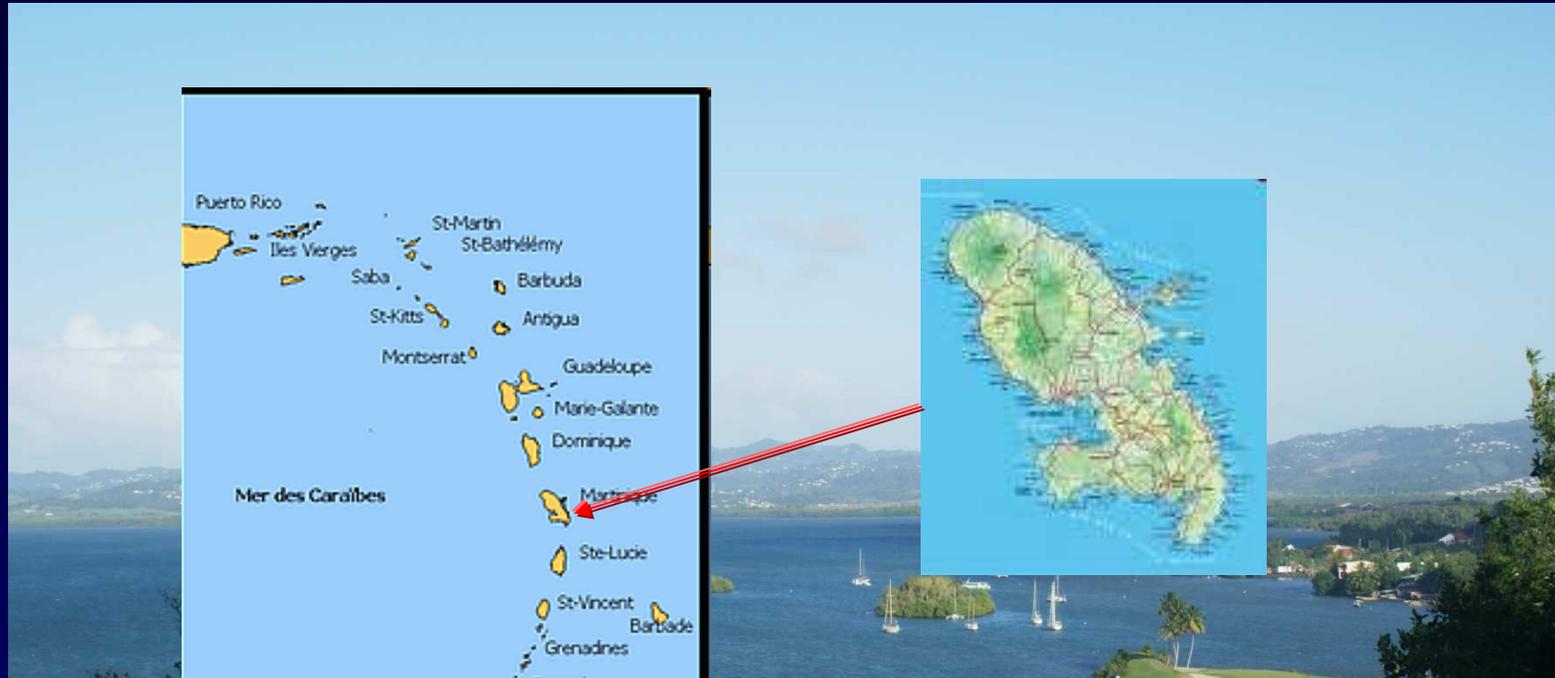
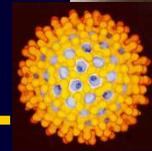
**Absence du génome  
de TOV RNA dans les  
échantillons testés**

# Plan



- Bilan sur la situation épidémiologique de la FCO en France de 2006-2010
- Outils moléculaires pour identification et typage des virus de la FCO - réseau de LVD
- Enquête sur la présence du virus Toggenburg
- **Nouveaux isolats du virus FCO en Martinique**
- Maladie épizootique hémorragique (EHD) à la Réunion

# Martinique



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

 ScienceDirect

Virus Research 129 (2007) 236–240

Virus  
Research

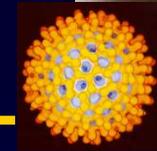
[www.elsevier.com/locate/virusres](http://www.elsevier.com/locate/virusres)

Short communication

## Phylogenetic comparison of the S10 genes of recent isolates of bluetongue virus from the United States and French Martinique Island

N. James MacLachlan<sup>a,\*</sup>, Stéphan Zientara<sup>b</sup>, David E. Stallknecht<sup>c</sup>, Joshua D. Boone<sup>a</sup>,  
Virginia H. Goekjian<sup>c</sup>, Corinne Sailleau<sup>b</sup>, Udeni B. Balasuriya<sup>a,1</sup>

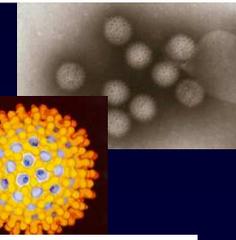
# FCO en Martinique



2006 : 30 bovins importés de métropole

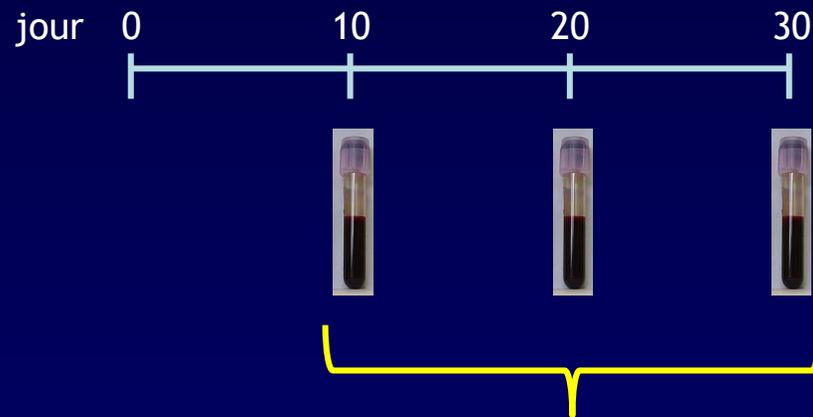


# Experimental design



🇺🇵 Bovins distribués dans 4 fermes différentes

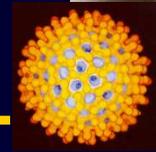
🇺🇵 Echantillons



- ELISA
- RT-qPCR de groupe
- Isolement (oeufs, BHK)



# Taux de séroconversion



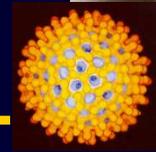
		D10		D20		D30	
		ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR
<b>A</b>	<b>N=8</b>	0	1	1	2	3	4
<b>B</b>	<b>N=10</b>	0	1	3	3	4	10
<b>C</b>	<b>N=8</b>	0	3	4	5	6	6
<b>D</b>	<b>N=4</b>	0	0	3	4	4	4
<b>TOTAL</b>	<b>N=30</b>	1	5	11	14	17	24

12 BT isolats appartenant aux 7 sérotypes (BTV-2, 9, 10, 17, 18, 22, 24).



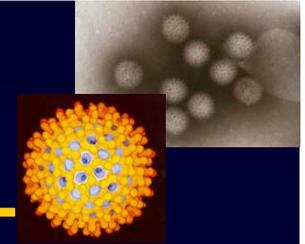
Analyse phylogénétique sur segments S2

# Martinique : conclusion



- Au moins 7 sérotypes (BTV-2, 9, 10, 17, 18, 22, 24) circulent dans l'île
- Forte divergence des séquences au sein des sérotypes
- Perspectives : séquençages des segments S7, 8, 9 et 10

# Bluetongue en Martinique en novembre 2009



Signes cliniques “FCO-like” sur des moutons



15/17 BTV ARN positifs (RT-qPCR)

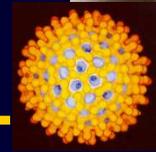
3 sérotypes identifiés :

- **BTV-1** (type-specific RT-qPCR)
- **BTV-13** (séquençage ; 91% similitude)
- **BTV-24** (séquençage ; 88% similitude)



Isolement viral et typage

# Plan



- Bilan sur la situation épidémiologique de la FCO en France de 2006-2010

- Outils moléculaires pour identification et typage des virus de la FCO - réseau de LVD

- Enquête sur la présence du virus

Toggenburg

- Nouveaux isolats du virus FCO en Martinique

- **Maladie épizootique hémorragique (EHD) à la**

**Réunion**

# EPIZOOTIC HAEMORRHAGIC DISEASE OF DEER VIRUS

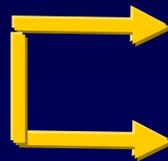
## maladie épizootique hémorragique des cervidés

- 7 ou 8 sérotypes
- Transmis par *Culicoides*
- Infecte la plupart des ruminants
- période d'incubation 5-10 jours
- Sites de réplication & pathogénie, similaire à virus de la FCO – mais signes cliniques surtout chez les cervidés, sauf Ibaraki (EHDV2, 6 et 7) chez les bovins

## 7/ 8 sérotypes

Reference strains							
EHDV-1 <u>USA1955/01</u>	EHDV-2 <u>CAN1962/01</u>	EHDV-3[M.Dom1] <u>NIG1967/01</u>	EHDV-4 <u>NIG1968/01</u>	EHDV-5 <u>AUS1977/01</u>	EHDV-6 <u>AUS1981/07</u>	EHDV-7 <u>AUS1981/06</u>	EHDV-8 <u>AUS1982/06</u>
	EHDV-2 (Ibaraki virus) <u>JAP1959/01</u>						

Table 3: Commonly accepted reference strains in the ds RNA virus collection at Institute for Animal Health (IAH) Pirbright, UK and at the Arthropod-Borne Animal Diseases Research Laboratory (ABADRL), USA.



- EHDV-1 New Jersey
- EHDV-2 Alberta, Ibaraki & CSIRO 439
- EHDV-3 Ib Ar 22619<sup>a</sup>
- EHDV-4 Ib Ar 33853
- EHDV-5 CSIRO 157
- EHDV-6 CSIRO 753
- EHDV-7 CSIRO 775
- EHDV-8 DPP 59

**SCIENTIFIC REPORT** submitted to EFSA

Scientific Review on Epizootic Hemorrhagic Disease<sup>1</sup>

Prepared by Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise  
"G. Caporale"

EHDV2, 6, 7 : signes cliniques bovins

- Fièvre, oedèmes, hémorragies anorexie, inflammation bourrelets coronaires, boiteries, diarrhée
- ulcères & érosions
- avortement
- Mortalité (surtout cerf “white-tailed deer”).



# DIAGNOSTIC

- maladie épizootique
- saisonnalité
- lésions hémorragiques

cependant..

Diagnostic différentiel:

FCO

Fièvre aphteuse

Ecthyma contagieux

Déficience en cuivre

Stomatite vésiculeuse

Pneumonie

Photosensibilisation

Etc.

**Diagnostic de laboratoire = essentiel**

# Diagnostic

Isolement viral

RT-PCR groupe S7 (conventionnelle)

RT-PCR groupe (real time)

RT-PCR type S2 et séquençage

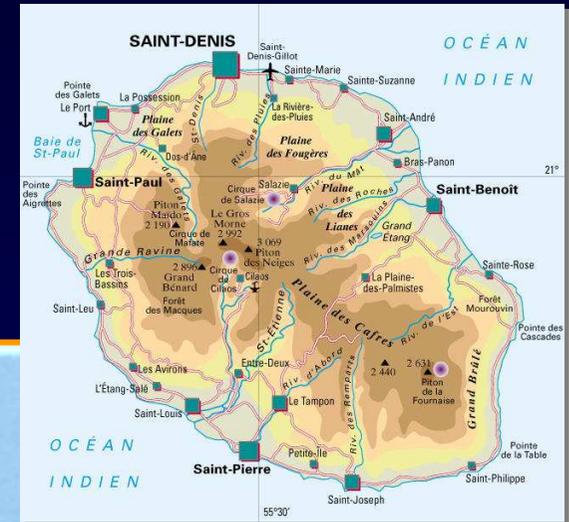
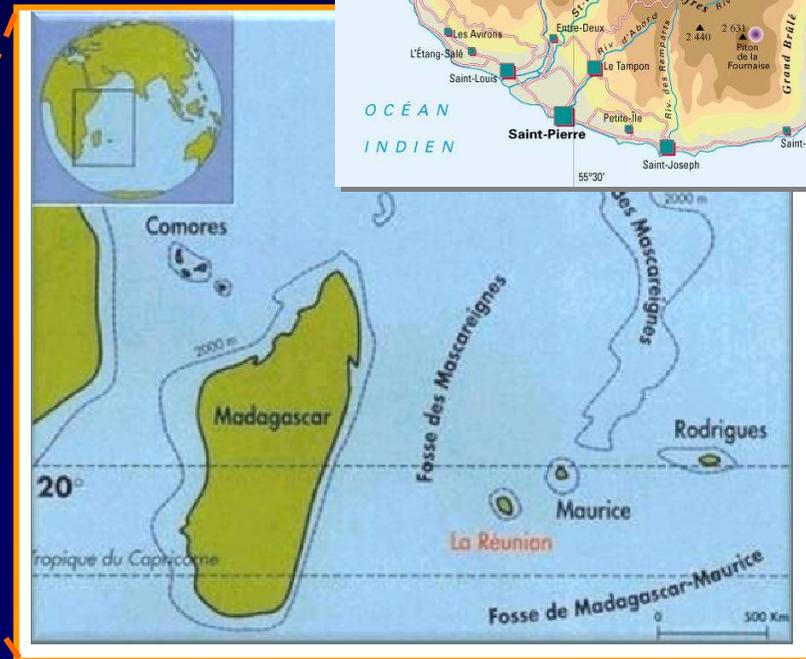
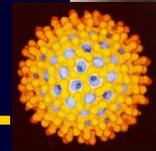
SN

ELISA groupe (non commercialisé)

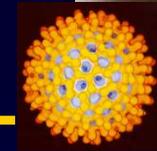
# Prévention

Pas de vaccins disponibles

# La Réunion



# Orbivirus à la Réunion



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Microbiology 106 (2005) 157–165

**veterinary  
microbiology**

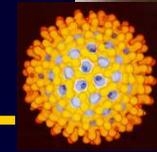
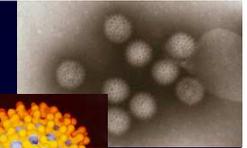
[www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Bluetongue virus in the French Island of Reunion

E. Bréard<sup>a,\*</sup>, C. Sailleau<sup>a</sup>, C. Hamblin<sup>b</sup>, S. Zientara<sup>a</sup>

- Isolement virus de la FCO sérotype 3 en 2003 et EHDV-6.

# Détection d'EHDV à la Réunion (Janvier 2009)



Signes cliniques chez les bovins  
évoqueurs de FCO



RT-PCR :

- 120 animaux **EHDV+**
- 5 animaux **EHDV+/BTV+**

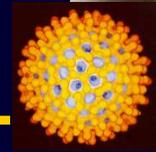
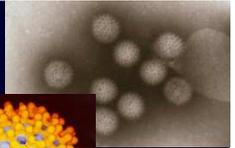


Isolement viral

- 1 souche BTV (**BTV-2** identifiée par SN et séquençage)
- 7 souches EHDV : segment 7 identique à séquence 2003  
Typage : **EHDV-6**



# remerciements



Valérie Chaignat, IVI  
Martin Hofmann, IVI  
Damien Vitour, Afssa  
Gina Zanella, Afssa  
Benoit Durand, Afssa  
Christophe Chartier, Afssa  
LVD  
DDSV Martinique, Réunion  
Micheline Adam, INRA  
Eric Sellal et coll, LSI  
Béatrice Blanchard et  
coll, AES-ADIAGENE

