

NOUVEAUX TESTS MOLÉCULAIRES POUR L'IDENTIFICATION RAPIDE DES SOUCHES QUÉBÉCOISES DU VIRUS DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE

Lucie Lamontagne^{1,3}, Jean-Pierre Vaillancourt^{2,3} et Tatiana Scorza¹

NUMÉRO : 810164

Durée : 06/2011 à 06/2014

FAITS SAILLANTS :

- 1) Ce projet a permis le développement de plusieurs tests moléculaires de RT-PCR en temps réel selon les chimies SybrGreen et TaqMan dans des buts d'identification, de quantification et de sérotypage probable rapide de virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) directement à partir d'écouvillonnages de la trachée et du cloaque ou d'organes.
- 2) Des sets d'amorces ciblant le gène de la polymérase du virus ont été dessinés pour la méthode avec du SybrGreen et validés pour la quantification et la détection spécifique de virus IBV directement dans des écouvillonnages et des organes de poussins en infections ou vaccination expérimentales ou provenant de cas cliniques.
- 3) Plusieurs sets d'amorces compatibles avec la chimie SybrGreen et ciblant la protéine de surface du virus, où sont localisés les régions hypervariables responsables des sérotypes du virus IBV, ont été développés et validés afin de permettre un sérotypage probable directement à partir d'ARN du virus IBV détectés dans les échantillons. Deux sets d'amorces permettent de différencier les sérotypes Mass-Conn- Holl alors que 4 sets d'amorces ont été développés spécifiquement pour les isolats du Québec reliés au Qu_mv.
- 4) La confirmation des sérotypes indiqués au point 3 peut être effectuée par une seconde technologie quantitative de RT-PCR utilisant la chimie TaqMan à l'aide de 4 sets d'amorces et de sondes spécifiques développés et validés pour les sérotypes Mass-Conn (incluant les souches vaccinales) et 4 autres sets d'amorces et de sondes spécifiques pour les souches du Québec reliées à l'isolat Qu_mv.
- 5) Tous ces outils moléculaires peuvent être utilisés en tout ou en partie dépendant des besoins de détection (études épidémiologiques), de quantification du virus dans les organes (évolution clinique) ou pour la détection de nouveaux virus variants ou recombinants dont les modifications génétiques se sont produites dans les régions géniques reconnues par ces différents outils moléculaires développés.

OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

L'objectif de ce projet était le développement de tests moléculaires de RT-PCR en temps réel spécifique au virus IBV et aussi spécifique aux principaux sérotypes d'IBV présents au Québec afin de détecter, de quantifier et d'identifier directement la présence du virus IBV, de ses sérotypes ou des variants présents dans les échantillons cliniques. Plusieurs sets d'amorces pour la technique de RT-PCR en temps réel selon la chimie SybGreen et des sets d'amorces et sondes pour la technique TaqMan ont été sélectionnés suite à l'analyse

1. Département Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal

2. Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal

3. Centre de Recherche en Infectiologie porcine et aviaire (CRIPA), Université de Montréal

bioinformatique du génome viral entier (environ 28 000 pb) de plusieurs souches et sérotypes des virus IBV Mass, Conn, Ark, et les souches Qu-mv par CLUSTWALL et par BLAST. Tous ces tests ont été validés avec des souches virales de références et des prélèvements provenant de poussins infectés et/ou vaccinés ou de cas cliniques du Québec.

RETOMBÉES SIGNIFICATIVES POUR L'INDUSTRIE

Suite à une analyse exhaustive de tous les gènes des différents sérotypes et isolats du virus IBV rencontrés au Québec, deux techniques de RT-PCR en temps réel ont été développées, chacune avec 8 tests différents. Des sets d'amorces pour la chimie SybrGreen et les couples amorces-sondes pour la chimie TaqMan ont été identifiés, sélectionnés, vérifiés pour leur haute spécificité et testés avec des souches virales de référence. Le test Poly 1a utilisant la chimie SybrGreen permet d'identifier tous les virus IBV avec une sensibilité beaucoup plus forte

que le test couramment utilisé (IBV-S1-litt) (5000 à 15,000 fois). Les tests S2-GM et S1-CMH ensemble servent à reconnaître le groupe des sérotypes Mass-Conn-Holl et à les différencier des souches du Québec reliées au Qu_mv qui elles sont spécifiquement reconnues par les tests Qu_mvS1.1, 1.2, 1.3 et 1.4. La confirmation du sérotype est effectuée par les tests TaqMan (S-Conn1, 2. SD-Mass1, 2) où les sérotypes Mass et Conn se différencient par une réaction plus forte avec le sérotype homologue; a la sonde choisie. Les tests TaqMan (S-Québec 1 et 2 principalement) pour les souches du Québec confirment qu'un isolat est bien relié à la souche Qu_mv et peuvent aussi servir à détecter des virus variants. À l'aide de cas de poussins infectés expérimentalement avec des isolats du Québec (Qu_mv ou Qu-16), vaccinés (Mass suivi de Mass-Conn) ou non, l'utilisation de ces différents tests a montré une très bonne corrélation et une meilleure sensibilité avec les résultats de l'isolement viral et du séquençage, du moins, dans la recherche du virus IBV, sa quantification et une identification probable directement à partir d'écouvillonnages de la trachée et du cloaque et d'extraits d'organes. L'algorithme présenté à la figure 1 montre comment utiliser ces différents tests selon des besoins de dépistage et de quantification du virus IBV (étape A), d'identification probable des sérotypes (étape B) et de sa confirmation ou de l'apparition de virus variants (étape C).

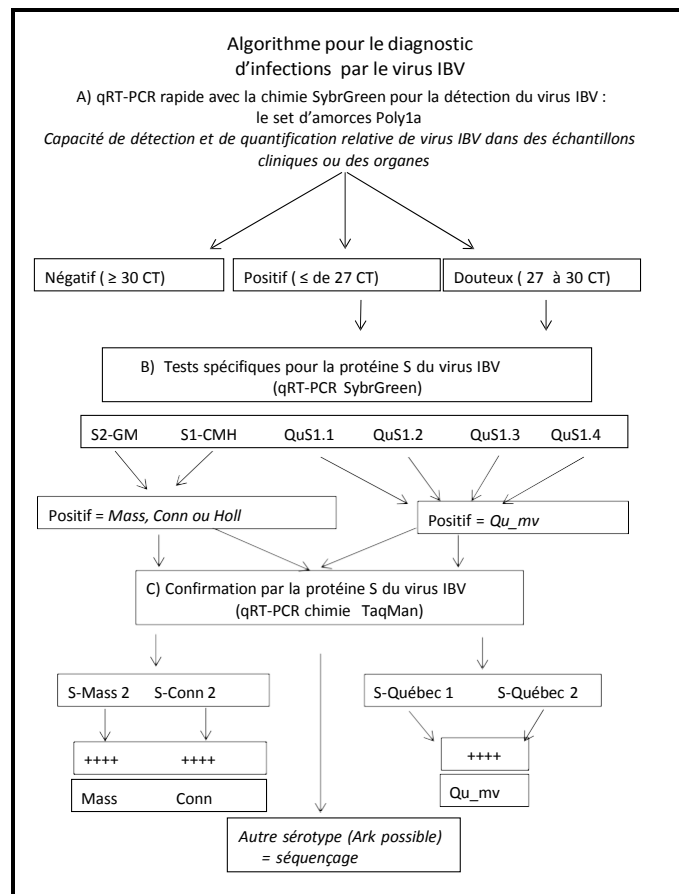


Figure 1 : Algorithme proposé pour la détection, la quantification et l'identification présumptive de la présence d'IBV dans des échantillons cliniques et des organes par des techniques de RT-PCR en temps réel.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET SUIVI À DONNER

Ce projet répond aux besoins actuels des éleveurs de volailles à cause : 1) de la présence régulière au Québec des maladies causées par l'IBV malgré les programmes de vaccination, 2) de l'apparition de nouvelles souches du virus IBV au Québec et 3) de l'introduction à court terme de nouvelles souches vaccinales et pathogènes en provenance de régions limitrophes au Québec. Ce projet apporte des outils de diagnostic moléculaires à la fine pointe de la technologie, rapides et hautement spécifiques pour la quantification de virus détection de nouvelles souches de l'IBV. Ces technologies ont un coût unitaire d'analyse très raisonnable, inférieur à celui des analyses basées sur l'isolement et le séquençage tout en donnant une réponse plus spécifique et rapide, et pouvant être réalisés facilement dans le laboratoire de pathologie animale du MAPAQ.

POINT DE CONTACT

Lucie Lamontagne
Université du Québec à Montréal
Tél. : 514-987-3000 poste 3184
Télécopieur : 514-987-4647
Courriel : lamontagne.lucie@uqam.ca

PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada.