

ENQUETES SEROLOGIQUE ET ANTIGENIQUE SUR LE VIRUS DE LA DIARRHEE BOVINE DANS LES ELEVAGES TRADITIONNELS DES DIFFERENTES REGIONS DU MALI

SEROLOGICAL AND ANTIGENIC STUDIES OF BOVINE VIRUS DIARRHOEA VIRUSES OF CATTLE IN TRADITIONAL ANIMAL HUSBANDRY IN DIFFERENT REGIONS OF MALI

DJENEBA SY¹, CLAUDIA.BAULE², FLABOU BOUGOUDOGO³, KARIM TOUNKARA⁴

¹ Centre national d'appui à la lutte contre la maladie, Bamako, Mali

²Département de Virologie, Box 585 SVA SE-751 89 Uppsala, Suède

³Institut National de Recherche en Santé Publique, BP 1771, Bamako, Mali

⁴Laboratoire Central Vétérinaire, BP : 2295, Route de Koulikoro, Bamako, Mali

Résumé

Le virus de la Diarrhée Bovine (BVD) est un Pestivirus associé à plusieurs maladies affectant le tractus digestif et les voies respiratoires des bovins. Le BVD sous forme de la maladie des muqueuses est très généralement confondu avec la Peste bovine et la Fièvre aphteuse à cause des érosions observées au niveau des muqueuses (3, 6). Au Mali les premières investigations ont montré la présence d'anticorps anti-BVD et des antigènes BVD dans le sang des animaux testés. Ainsi dans la présente étude nous avons analysé des prélèvements de sérums et de sang entier dans les élevages urbains et péri urbains du District de Bamako et de différentes régions du Mali. Au total un nombre de 730 échantillons dont 438 de sérums et 292 de sang complet ont été prélevés et testés par les techniques d'ELISA. Une prévalence sérologique de 23,28% et une prévalence antigénique de 28% ont été obtenues. La confirmation de l'infection par le virus BVD a été faite avec la réaction de polymérisation en chaîne avec quelques échantillons positifs et négatifs pris au hasard par localité.

Mots clés : BVD, sérologie, ELISA, PCR, Mali

Abstract

Bovine Diarrhea Virus (BVD) is a Pestivirus associated with several diseases affecting the digestive tract and respiratory tract of cattle. BVD in the form of mucosal disease is very commonly confused with rinderpest and foot-and-mouth disease because of the erosions observed in the mucous membranes (3, 6). In Mali, the first investigations showed the presence of anti-BVD antibodies and BVD antigens in the blood of the animals tested. Thus in the present study we analyzed serum and whole blood samples from urban and peri-urban farms in the District of Bamako and different regions of Mali. A total of 730 samples, including 438 serum and 292 whole blood, were collected and tested using ELISA techniques. A serological prevalence of 23.28% and an antigenic prevalence of 28% were obtained. Confirmation of infection by the BVD virus was made with the polymerase chain reaction with a few positive and negative samples taken at random by locality.

Key words: BVD, serum, blood, ELISA, PCR, Mali

1. Introduction

Le virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV) appartient à la famille des Flaviviridae et au genre Pestivirus. Les maladies comme la Fièvre Porcine Classique et la maladie de frontière chez les ovins ou "Border Disease" appartiennent également à cette famille. C'est un virus à ARN avec environ 12,5 kilobases qui code pour les protéines structurales et non structurales du virus (Ohmann, B. et al., 1995).

Le virus BVD peut être séparé en deux génotypes BVDV type I et BVDV type II ou encore dans la nouvelle division proposée Pestivirus type 1 et type 4 respectivement. Sur la base de leur habilité à induire un effet cytopathogène en culture cellulaire les souches de BVDV sont divisées en deux biotypes cytopathogène (cp) et non cytopathogène (ncp). La souche cp peut être d'origine extérieure ou peut provenir d'un changement génétique de la souche ncp qui est à l'origine de l'infection persistante. Les signes cliniques lors de l'infection aiguë montrent la fièvre, la leucopénie, décharge nasale, diarrhée, érosion sur la muqueuse orale, alopecie et l'immunosuppression (Baule, C. et Belak, S. 2001 ; Bolin, S. et al., 1995 ; Bolin, S. et al., 1995).

Une infection des femelles gestantes peut entraîner une infection fœtale trans-placentaire. Le fœtus peut avorter, être momifié ou naître avec de sévères anomalies, qui représente une source permanente d'excrétion de virus. Ainsi ces animaux lors d'une deuxième infection par une souche cytopathogène de BVDV développent la maladie des muqueuses, qui elle, a une faible morbidité et une très forte mortalité. Elle se caractérise par une érosion extensive au niveau des muqueuses buccales et gastro-intestinales et la diarrhée profuse.

Aucune étude n'a été faite auparavant sur les diarrhées d'origine virale au Mali ; ce qui justifie la motivation pour le sujet sur la BVD dans ces travaux et de plus, au niveau de notre laboratoire la disponibilité de nouvelles techniques de diagnostic par ELISA permettant de rechercher les anticorps et les antigènes de la diarrhée virale des veaux dans le sérum, le sang entier et le lait. La technique d'amplification génétique ou RT-PCR a permis d'approfondir ces études. L'intérêt très particulier pour ce virus est qu'il provoque des symptômes qui prêtent à confusion avec ceux de la Peste bovine, maladie dont le Mali est indemne mais dont le diagnostic différentiel tient compte du BVD et de la Fièvre aphteuse dans son programme d'éradication définitif.

2. Matériel et méthodes

Echantillonnage

Les prélèvements d'échantillons de sang total et de sérums ont été effectués chez les bovins dans la périphérie du District de Bamako, les zones périurbaines des régions de Kayes, Koulikoro, Sikasso, Ségou, Mopti et Gao. L'échantillonnage était aléatoire. Au total 730 prélèvements ont été effectués dont 60 veaux âgés de 6 mois à 16 mois et 670 bovins adultes âgés de 18 mois à 8 ans. Adultes : les échantillons comprenaient 438 sérums et 292 sangs totaux.

ELISA pour la détection des anticorps

Pour la détection d'anticorps les Kits de la compagnie SVANOVA produits en Suède, de même que les kits CHEKIT BVD Sero-II de la compagnie BOMMELI en Belgique ont été utilisés selon leur disponibilité au niveau de notre laboratoire. Les plaques préfixées avec l'antigène du virus BVD sont fournies avec les kits, les réactifs pour le test et le protocole a été effectué selon les instructions du fabricant.

ELISA pour la détection des antigènes

Pour la recherche des antigènes viraux BVD les Kits de la compagnie SVANOVA produit en Suède, de même que le kit CHEKIT BVD Virus-III de la compagnie BOMMELI en Belgique ont été utilisés. Ces différents kits offrent des plaques d'ELISA de 96 puits dans lesquelles sont déjà fixés des anticorps spécifiques au virus BVD pour la recherche du virus. En plus de ces plaques les kits fournissent les contrôles positifs et négatifs, le conjugué, le substrat pour la révélation et la solution d'arrêt.

Reverse transcription-réaction de polymérisation en chaîne

Extraction d'ARN : l'ARN total est extrait de différents échantillons (sérum et sang total), en utilisant le TRIZOL comme réactif (Invitrogen) qui s'est avérée être la méthode la plus simple pour la majorité des échantillons. Les différents échantillons traités étaient positifs au test d'ELISA.

La synthèse de cDNA : pour l'amplification des petites portions, la synthèse de cDNA s'est faite avec l'enzyme M-MLV pour la reverse transcription (Invitrogen), et les Random hexa nucléotidiques pds (N)6 (Amers Ham Bioscience). Le thermocycleur de type PTC 100 (MJ RESEARCH INC) a été utilisé pour l'amplification.

Réaction de polymérisation en chaîne : deux tests d'amplification ou "Nested-PCR" ont été utilisés. La première réaction ou PCR I permet l'amplification de 296 bp à l'extrémité 5'NCR à partir des cDNA. La deuxième amplification utilisant des amorces internes au produit de PCR I (Laboratoire de Virologie Vétérinaire SVA Box 585 S-751 23, Uppsala, Suède) et permet d'amplifier un fragment plus petit de manière plus sensible et plus spécifique. Les produits d'amplification ont été migrés sur gel d'agarose à 8%. Les bandes ont été visionnées après coloration au bromure d'ethidium à 1% avec une lampe UV.

3. Résultats

Résultats de la recherche d'antigènes par ELISA

Tableau 1 : nombre d'animaux positifs à la recherche d'antigène BVD dans les différentes localités visitées.

Villes/Régions	Nombre d'éch. de sang	Positifs recher. D'ag.
District de Bamako	78	22
Kayes	5	3
Koulikoro	97	29
Sikasso	-	-
Ségou	92	17
Mopti	10	6
Gao	10	5
Total	292	82

D'éch.: échantillons recher. d'ag : recherche d'antigènes - : pas de sang disponibles

Toutes les régions donnent des résultats positifs à la recherche du virus BVD indiquant son passage chez les animaux à l'exception de la région de Sikasso où les échantillons étaient inexploitable.

Résultats de la détection d'anticorps par ELISA

Les résultats nous indiquent la présence d'anticorps dans toutes les localités et cela malgré les différences climatiques enregistrées entre les régions.

Tableau 2 : nombre d'animaux positifs à la recherche d'antigènes BVD dans les différentes localités visitées

Villes/Régions	Nombre d'éch. de sang	Positifs recher. d'ag.
District de Bamako	81	18
Kayes	5	2
Koulikoro	178	40
Sikasso	38	20
Ségou	116	18
Mopti	10	3
Gao	10	1
Total	438	102

Ag : antigènes recher. d'ag : recherche d'antigène éch. : échantillons

Prévalence des anticorps et des antigènes positifs

Le tableau ci-dessous donne le récapitulatif de la prévalence des échantillons analysés pour la recherche d'anticorps et d'antigène avec les pourcentages de positivité.

Tableau 3 : prévalences des animaux positifs par rapport à la détection d'anticorps et à la recherche antigénique de BVD.

Nombre de sérums positifs / Total	102 / 438	23,28% de positif
Nombre de sang positifs/ Total	82 /292	28% de positif
Total des éch. Sang +sérum	730	

éch.: échantillons

Réverse transcription-réaction de polymérisation en chaîne

Les résultats sont donnés dans les figures suivantes :

Figure :

Les résultats obtenus avec la réaction de polymérisation en chaîne pour la recherche spécifique du virus BVD sont donnés des bandes spécifiques dans les figures 1, 2, 3 et 4 qui suivent avec un nombre de paires de bases de 169 (169 bp) bien. Les échantillons comprenant aussi bien les sangs que les sérums de bovins récoltés dans les différentes régions ont été testés.

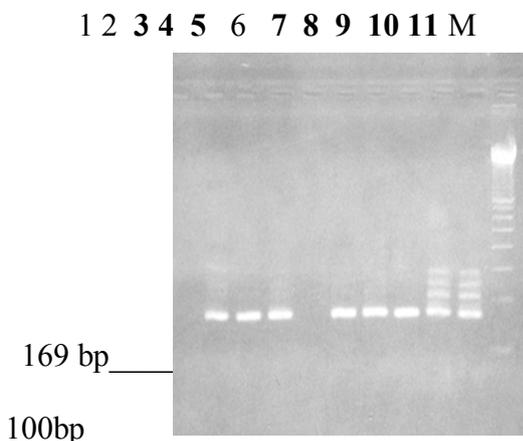


Figure 1 : analyse par PCR des échantillons de la région de Koulikoro.

Les résultats de l'amplification PCR II montrent que toutes les bandes spécifiques au BVDV sont observées au poids moléculaire de 169 bp. Les échantillons de sang complet de deux localités proches du District ont été utilisés pour l'amplification, Baguinéda (échantillons N° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8) et Koulikoro (échantillon N° 9). Les échantillons **3, 4, 5, 7, 8 et 9** sont positifs. Les trois échantillons N° 1, 2 et 6 sont négatifs. Les deux échantillons contrôles positifs N°10 et 11 sont également positifs. Les bandes supplémentaires observées (N° 10 et

11) à des poids moléculaires variant de 200 à 300 bp sont des résidus des produits PCR I 296 bp), à partir desquels ont été effectués la PCR II. Le standard leader paire de base de 100, indiqué sur le gel de bas en haut 100bp, 200 bp ainsi de suite jusqu'à 1000 b, permet d'avoir une référence pour le poids moléculaire des bandes des échantillons analysés.

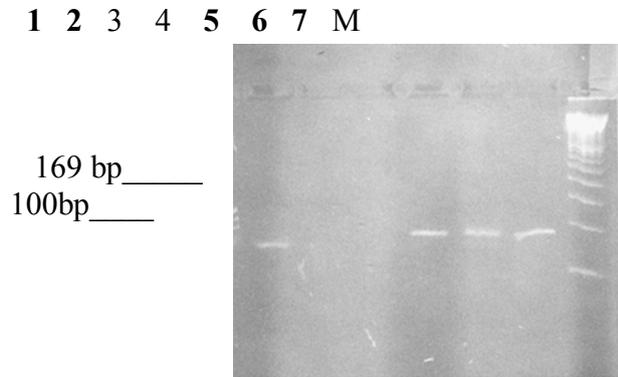


Figure 2 : analyse par PCR des échantillons des régions de Ségou et Koulikoro.

Résultats de la PCR II avec les différents échantillons des régions de Ségou (N°1, 2, 3) et Koulikoro (N° 5, 6), le contrôle négatif H₂O (N°4), le contrôle positif (N°6) et le standard de base leader (N°8). Dans cette figure des bandes spécifiques ont été obtenues et elles sont toutes au poids moléculaire de 169 bp. Les échantillons de sérums positifs sont de Ségou 1 plus bas à cause de la déformation du gel et de Koulikoro 5 et 6, de même que le contrôle positif 7 donnent les différentes bandes observées et rien avec le contrôle négatif H₂O.

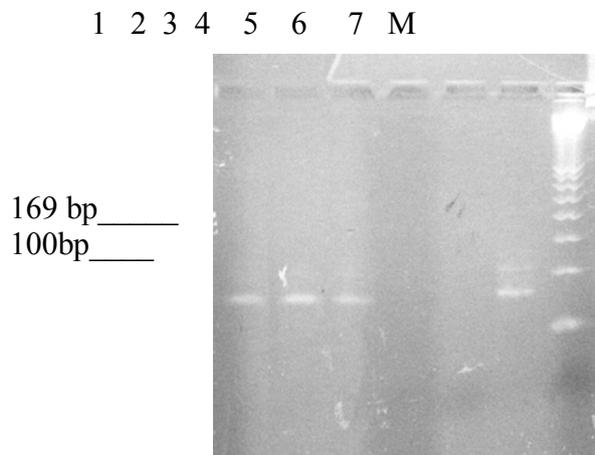


Figure 3: analyse par PCR des échantillons des régions de Gao, Mopti et Koulikoro.

Résultats de l'amplification de la PCR II des échantillons de différentes régions. Le contrôle positif (N°7) montre une bande de 169 paires de base de même que les échantillons N° 2 (sérum de la région de Gao), N° 3 (sang des bovins du laboratoire) et N° 4 (sérum de la région de Mopti) et le poids moléculaire standard 100 paires de base leader. Les échantillons N° 1 (antigène de la région de Gao) et N° 5 (sang de la région de Koulikoro) sont négatifs de même que le contrôle négatif H₂O (N°6).

4. Discussion

Nous avons mené une enquête sérologique et antigénique sur le virus de la diarrhée virale bovine au Mali et qui est le même virus qui cause la maladie des muqueuses avec la confirmation de détection du virus par la RT-PCR. Il ressort de cette enquête que le virus de la diarrhée virale bovine existe sur l'ensemble du territoire national. Les résultats obtenus montrent un pourcentage de 23,28% de présence d'anticorps dans le sérum des animaux prélevés et de 28% pour la recherche d'antigènes au niveau de leur sang.

Dans les résultats de la détection par la PCR, des bandes spécifiques de 169 bp ont été obtenues, correspondant à l'amplification de la portion interne de 296 bp de l'extrémité 5' terminal du génome. Avec les différents résultats obtenus, même si toutes les zones des différentes régions du Mali ne sont pas encore couvertes par nos expériences on peut déjà dire que le virus BVD circule sur l'ensemble du territoire national. Pour le moment aucun cas clinique n'a été signalé malgré ces investigations, ce qui peut s'expliquer par une méconnaissance de la maladie et non son inexistence au Mali.

En marge de ces premières expériences, d'autres recherches plus élargies à l'ensemble du territoire doivent être entreprises ceci permettra de renforcer le diagnostic différentiel avec les maladies comme la Peste bovine et la Fièvre aphteuse.

Ces résultats ne nous permettent pas pour le moment de parler des deux groupes de BVD, mais donnent des indications sur l'existence de souches de BVDV. Ainsi après cette première étude on pourrait procéder dans le futur au séquençage de ces souches pour confirmer l'existence de plusieurs souches.

Des travaux similaires qui ont été menés par d'autres chercheurs sur la BVD avec les isolats de l'Afrique du sud et du Mozambique ont montré deux groupes appartenant au génotype I de BVD, et il y avait une différence de 18-23% de la séquence nucléotidique entre les deux groupes (Baule, C. et al., 1997).

La possibilité que les antigènes réagissant positivement à la détection d'antigènes par ELISA ne donnent pas de résultats peut s'expliquer par la présence de capsides virales vides qui n'ont pas d'ARN et non par une différence au niveau génomique. Ceci est d'autant plus vrai du fait que les amorces utilisées reconnaissent la partie hautement conservée de 5'NCR capable de reconnaître toutes les souches de Pestivirus et pour cette raison elle a été choisie par plusieurs équipes comme région cible du génome viral pour faire la discrimination entre les génomes des Pestivirus (Ohmann, B. et al., 1995).

D'autre part les similarités et les différences entre les souches provenant du Mali, d'Afrique du Sud, de l'Europe ou de l'Amérique ne pourront être mises en évidence que lorsqu'on pourra procéder au séquençage que nous envisageons dans nos prochains travaux.

5. Conclusion

La présente étude a démontré par la recherche d'antigène la présence du virus de la diarrhée bovine sur l'ensemble du territoire national du Mali. Des cas de maladie des muqueuses n'ont pas été signalés jusqu'à présent ; ce qui peut être due à une méconnaissance de la maladie généralement confondue avec d'autres maladies comme la peste bovine ou la fièvre aphteuse. Des possibilités de variations génétiques n'ont pas pu être observées avec nos résultats, mais elles pourront être vérifiées avec les analyses de séquençage. Il est important de noter que les premières investigations montrent que les diarrhées observées chez les bovins sont aussi d'origine virale. Il serait temps d'approfondir les recherches sur les diarrhées d'origine virale pour mettre en place des moyens de contrôles adéquats et une meilleure prophylaxie par la disponibilité de vaccins.

Remerciements

- A l'Agence Internationale de l'Energie Atomique, Vienne (Autriche).
- Laboratoire Central Vétérinaire, Bamako (Mali)
- Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée, Bamako (Mali)
- National Veterinary Institute, Uppsala (Suède)

Références

- Baule, C. et al., 1997. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. *Virus Research*, 52 205-220, 1997.
- Baule, C. et Belak, S. 2001. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type 1. *J. Of Clinical Microbiology*, Vol. 39, N° 1 146-153 Jan., 2001.
- Bolin, S. R. et Ridpath, J.F., Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53, 2157-2163, 1992
- Bolin, S. et al., 1995. The pathogenesis of Mucosal Disease, *Veterinary clinic of north America Food animal practice*, vol. 11 N° 3 novembre, 489-500, 1995.
- Browlie, J. 1990. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9, 43-59, 1990.
- Edwards, S. et al., 1995. Antigenic differences among Pestivirus, *Veterinary clinic of north America Food animal practice*, vol. 11 N° 3 novembre, 563-577, 1995.
- Ohmann, B. et al., 1995. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection, *Veterinary clinic of north America Food animal practice*, vol. 11 N° 3 novembre, 447-475, 1995.