

# Application de la dPCR pour la surveillance quantitative de l'herpès-virose endothélotrope de l'éléphant (EEHV)

Ornelas-Eusebio E<sup>1</sup>, Tetard C<sup>1</sup>, Chossat M<sup>1</sup>, Frontera V<sup>2</sup>, Devergnas S<sup>2</sup>, Pozzi N<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Départemental d'Analyse, Agrivalys71 | 18 rue de Flacé, 71000 Mâcon | France

<sup>2</sup>QIAGEN France SAS | 3 avenue du Canada, 91974 Courtaboeuf cedex | France

[e.ornelas-eusebio@agrivalys71.fr](mailto:e.ornelas-eusebio@agrivalys71.fr)

## Contexte

L'EEHV est une maladie hémorragique aiguë et mortelle qui décime les jeunes éléphants d'Asie et d'Afrique sauvages et en captivité. L'EEHV comprend huit génotypes, dont chacun varie en termes de létalité et présente un certain degré de tropisme pour les différentes espèces d'éléphants. Les éléphants infectés sont porteurs du virus et la transmission se fait horizontalement. Seuls les éléphanteaux peuvent déclarer la maladie qui se traduit par une soudaine baisse d'activité, et la présence de lésions hémorragiques qui les emportent dans les heures qui suivent la crise. En l'absence de vaccin, **l'examen clinique, l'hémogramme** et la **quantification virale** dans le sang ou les sécrétions nasales, sont actuellement les seuls outils permettant d'instaurer un traitement rapide et d'augmenter les chances de survie. L'objectif de ce travail était donc d'appliquer la PCR digitale (dPCR) comme outil de détection quantitative de l'EEHV et de comparer les résultats avec ceux obtenus par qPCR, en utilisant des échantillons provenant d'un cas clinique d'EEHV.

## Méthodologie

- Détection des **Herpesvirus** sur des **extraits d'ADN de sang d'éléphanteaux**.
- Des ADN standards titrés ont été utilisés pour mettre en place la **qPCR** des 8 génotypes différents (**quantification relative**).
- Extraction : DNeasy Blood & Tissue kit.
- Expérience dPCR : plusieurs protocoles d'optimisation ont été appliqués sur 15 extraits d'ADN issus d'un cas clinique.
- Les résultats obtenus par qPCR pour ces 15 échantillons ont été comparés à ceux obtenus par dPCR.

## Résultats

- La dPCR permet une **quantification absolue** sans nécessité d'une courbe standard de référence (ADN standards titrés) : **économie de temps et de réactifs**.
- Quantification par qPCR **comparable** à celle obtenue par dPCR, mais:
  - ✓ En distribuant l'échantillon sur les 26 000 partitions, il y a une **plus grande tolérance aux inhibiteurs**.
  - ✓ La dPCR permet de **gagner en précision et en résolution** par rapport à la qPCR.
  - ✓ La dPCR en nanoplaque offre la possibilité de réaliser des cycles supplémentaires pour affiner la recherche de la cible.

### Protocole optimisé

Concentration des sondes et amorces conformément aux recommandations de QIAGEN pour la dPCR et dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> pour diminuer l'effet des inhibiteurs potentiellement présents dans l'échantillon (sang).

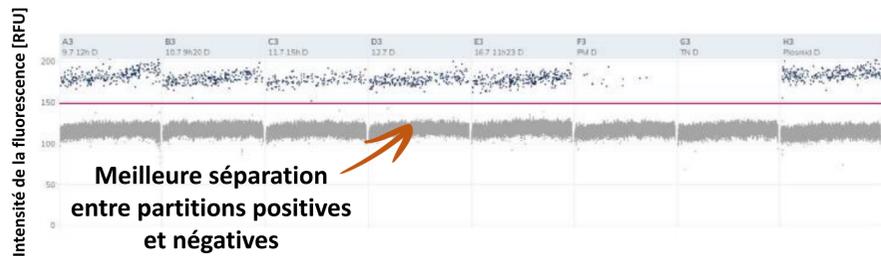


Tableau comparatif des résultats obtenus par qPCR et des résultats obtenus par dPCR

| Echantillon | C <sub>T</sub> qPCR | Quantification relative qPCR [copies/μl] | Quantification absolue dPCR [copies/μl] |
|-------------|---------------------|--|---|
| 9.7.12h     | 25.82               | 1551                                     | 1107.6                                  |
| 10.7.9h     | 25.56               | 1860                                     | 1008.4                                  |
| 12.7.10h    | 25.45               | 1297                                     | 1032.2                                  |
| 16.7.11h.23 | 25.90               | 958                                      | 1195.1                                  |

Surveillance des éléphanteaux

Pour détecter de faibles concentrations virales avant l'apparition de signes cliniques

Pour détecter l'excrétion virale au cours de la convalescence ou à la suite de la réactivation d'une infection latente

QIAcuity Digital PCR System

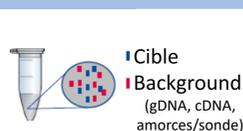


QIAcuity Probe PCR kit

Nanoplate 26K 24- puits 26 000 partitions



**Etape 1** Dilution de l'échantillon et préparation du mélange réactionnel PCR



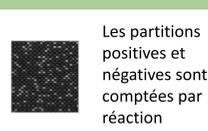
**Etape 2** Création de partitions pour la PCR



**Etape 3** Amplification par PCR conventionnelle 'end-point'



**Etape 4** Lecture et quantification absolue



## Conclusion

La **surveillance régulière des éléphanteaux** permet une détection précoce de faibles niveaux d'EEHV dans les échantillons de sang **avant l'apparition de signes cliniques**. Cette surveillance est **recommandée** comme un complément indispensable à la prise de décision concernant le déclenchement d'un protocole thérapeutique. À ce jour, le laboratoire a reçu des échantillons d'éléphanteaux provenant de **4 parcs animaliers**.

Avec une **sensibilité plus élevée pour de très faibles concentrations d'ADN**, la dPCR s'est avérée **l'outil de diagnostic idéal pour quantifier avec précision la charge virale**. La dPCR a également d'autres applications potentielles, par exemple la surveillance des maladies (ex. influenza), la quantification en cas d'infections mixtes (pathologies abortives, respiratoires, causes de diarrhée), la détection de mutations indicatrices de résistance aux antimicrobiens, etc., dans le cadre de la santé animale, des végétaux et de l'hygiène alimentaire.

Pour en savoir plus :



<https://eehvinfo.org/professional-content/>



Rencontres Nationales de Santé Publique Vétérinaire

15-16 Octobre 2024  
Strasbourg